

Étude de la dégradation de la cellulose par une bactérie du genre *Cellulomonas*

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Pierre BÉGUIN
de Genève

Thèse No 1804

GENÈVE
Imprimerie de la Section de Physique
1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Étude de la dégradation de la cellulose par une bactérie du genre *Cellulomonas*

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par
Pierre BÉGUIN
de Genève

Thèse No 1804

GENÈVE
Imprimerie de la Section de Physique
1977

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs H. EISEN, professeur extraordinaire et directeur de thèse, J. DESHUSSES, professeur extraordinaire (Département de biochimie) et J.A. SHAPIRO, professeur (Université de Chicago), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 11 février 1977

Le Doyen:

Jean MULLER

Thèse No 1804



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé à réaliser ce travail, et en particulier Yves Marco, qui m'a prêté sa résine de valine-Sepharose.

Ma reconnaissance va également aux professeurs Jacques Deshusses et James Shapiro, qui ont bien voulu accepter d'être mes jurés de thèse, et bien entendu au professeur Harvey Eisen, qui a su diriger ce travail en stimulant de manière constante mon intérêt vers les thèmes qui avaient des chances de se révéler fructueux.

TABLE DES MATIERES

	Page
Table des abréviations	7
I. Introduction.....	8
1. Utilisation de la cellulose par les organismes	
cellulolytiques	8
1.1. Utilisations pratiques	8
1.2. Nature du substrat cellulosique	10
1.3. Mécanismes de dégradation	11
1.4. Localisation des enzymes	14
1.5. Régulation	15
2. Plan des travaux effectués	16
II. Matériel et méthodes	17
1. Souches	17
2. Conditions de culture	17
3. Produits chimiques	17
4. Préparation de gluconolactone-Sepharose	18
5. Méthodes analytiques	18
5.1. Mesure de la croissance en présence de	
cellulose	18
5.2. Dosage de l'activité β -glucosidase	19
5.3. Dosage de l'activité cellobiase	19
5.4. Dosage de l'activité cellulase soluble	20
5.5. Activité liée à la cellulose	20
5.6. Mesures de viscosité	21
5.7. Dosage des protéines	21
5.8. Concentration en sels	22
5.9. Gels SDS dénaturants	22
5.10. Gels non dénaturants	22

	Page
6. Génétique	23
6.1. Mutants incapables de pousser sur cellobiose ...	23
6.1.1. Mutagenèse	23
6.1.2. Sélection à l'ampicilline	23
6.1.3. Sélection sur boîtes cellobiose	23
6.2. Mutants incapables de pousser sur cellulose	23
6.3. Révertants des mutants incapables de pousser sur cellobiose	24
6.4. Mutants résistants aux antibiotiques	24
III. Résultats et discussion	25
1. Propriétés du système	25
1.1. Taxonomie	25
1.2. Taux de croissance	25
2. Métabolisme des β -glucosides	27
2.1. Dosage	27
2.2. Localisation de l'activité β -glucosidase	29
2.3. Séparation et caractérisation des β -glu- cosidases	29
2.3.1. Préparation de l'extrait brut	29
2.3.2. Colonne de DEAE-cellulose	30
2.3.3. Colonne de Biogel P-150	30
2.3.4. Colonne de valine-Sepharose	32
2.3.5. Colonne de Biogel à haute force ionique ...	35
2.3.6. Colonne de gluconolactone-Sepharose	35
2.3.7. Bilan	37
2.3.8. Propriétés enzymatiques	40
2.3.8.1. Affinité pour le PNPG	40
2.3.8.2. Inhibition par le cellobiose	40
2.3.8.3. Hydrolyse du cellobiose	43

	Page
2.3.9. Discussion	43
2.4. Régulation	44
2.5. Mutants affectés dans le métabolisme du cellobiose et de la cellulose	48
2.5.1. Mutants incapables de pousser sur cellobiose (<u>clb</u> ⁻)	49
2.5.2. Mutants incapables de pousser sur cellulose (<u>cls</u> ⁻)	52
2.5.3. Complémentation extracellulaire en cul- ture mixte avec le type sauvage	56
3. Cellulases	59
3.1. Généralités	59
3.2. Localisation; présence d'enzymes liées à la cellulose	59
3.3. Cinétique d'apparition des cellulases en fonction de la croissance de la culture	61
3.4. Multiplicité des enzymes cellulolytiques	63
3.5. Purification et caractérisation préliminaire de trois endocellulases	63
3.5.1. Source	63
3.5.2. Purification d'une endocellulase présente dans le surnageant (cellulase I)	65
3.5.2.1. Centrifugation	65
3.5.2.2. Chromatographie d'adsorption sur Sephadex G-25	65
3.5.2.3. Colonne de Biogel P-150	67
3.5.3. Purification de l'endocellulase CA liée à la cellulose	67
3.5.3.1. Elution de la cellulose	67

3.5.3.2. Colonne de DEAE-Sephadex A-50	70
3.5.3.3. Chromatographie sur Sephadex G-200	72
3.5.4. Purification de l'endocellulase CB	
liée à la cellulose	73
3.5.4.1. Elution de la cellulose	73
3.5.4.2. Chromatographie sur Sephadex G-25	73
3.5.4.3. Filtration sur Biogel P-150	73
3.5.5. Pureté des enzymes obtenues	76
3.5.6. Bilans	76
3.5.7. Poids moléculaires	78
3.5.8. Glycosylation	78
3.5.9. Propriétés enzymatiques	80
3.5.9.1. Activité endocellulolytique	80
3.5.9.2. Non linéarité de la cinétique d'	
hydrolyse	80
3.5.9.3. Activité vis-à-vis de la cellulose CF 11	84
3.5.10. Discussion	84
3.6. Fractionnements préliminaires des autres	
activités cellulolytiques présentes dans	
le surnageant	87
3.6.1. Identité de l'enzyme I et du pic C	87
3.6.2. Séparation de l'activité correspondant	
au pic D	87
3.6.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	
en présence de BSA	87
3.6.2.2. Chromatographie sur Sephadex G-25	89
3.6.2.3. Chromatographie sur DEAE-sephadex A-50 .	89
3.6.2.4. Identification	93
3.6.3. Activité s'adsorbant à la Con A -Sephrose .	93

3.7. Régulation	95
3.7.1. Répression catabolique par les sources de carbone de faible poids moléculaire	98
3.7.2. Induction spécifique par la cellulose	98
3.7.3. Tentatives d'induction par des substrats solubles pouvant pénétrer dans les bactéries	100
3.7.4. Discussion	102
3.8. Effet du pyruvate sur la croissance et la pro- duction de cellulases	105
4. Récapitulation et conclusion	111
Références	114

Abréviations

CMC :	Carboxyméthylcellulose soluble
BU :	Tampon contenant du phosphate disodique 44 mM, du phosphate monopotassique 22 mM, du chlorure de sodium 68 mM et du sulfate de magnésium 0,5 mM
PNPG :	p-nitrophényl- β -glucoside
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
TCA :	Acide trichloracétique
BSA :	Albumine de sérum de boeuf
Con A :	Concanavaline A

I. INTRODUCTION

Avant de décrire les expériences que j'ai effectuées sur la dégradation de la cellulose par Cellulomonas, un bref tour d'horizon s'impose afin de faire le point sur d'autres systèmes, qui ont été étudiés plus en détail.

1. Utilisation de la cellulose par les organismes cellulolytiques

1.1. Applications pratiques

La majeure partie de l'énergie solaire captée par la photosynthèse est disponible sous forme de cellulose. La récupération et la réutilisation efficace des déchets cellulosiques représente donc un moyen important de lutter contre un gaspillage de matières premières coûteux et de plus nuisible sur le plan écologique.

Abstraction faite de ses usages directs (papier, textiles), la cellulose peut être utilisée de trois manières (Humphrey, 1975) :

- a) Production d'énergie, soit par combustion directe, soit surtout par conversion en un combustible d'utilisation plus pratique comme l'éthanol.
- b) Conversion en matières premières pour l'industrie chimique.
- c) Production de nourriture, et en particulier de protéines pouvant servir à compléter l'alimentation de l'homme ou du bétail.

Les deux premières utilisations impliquent une transformation de la cellulose en un petit nombre de produits bien définis. Celle-ci est accomplie de la manière la plus

efficace par dégradation enzymatique fournissant du glucose, qui peut lui-même être converti par fermentation en divers produits organiques simples dont l'éthanol. Il est donc de première importance de disposer de grandes quantités d'enzymes (cellulases) capables de digérer par elles-mêmes une fraction maximum de la cellulose. les meilleures sources de cellulase disponibles proviennent actuellement de champignons cellulolytiques (Trichoderma, Sporotrichum), ce qui explique que l'intérêt et la recherche se soient portés principalement sur ces organismes.

Pour la transformation en protéine alimentaire, la cellulose ou le glucose qui en est obtenu par digestion enzymatique préalable sont utilisés comme source de carbone servant à faire pousser un organisme dont on peut ensuite extraire le protéine. L'utilisation directe de la cellulose nécessite bien entendu un organisme cellulolytique; il n'est cependant pas indispensable que celui-ci permette d'isoler de grandes quantités de cellulases actives, étant donné qu'on ne cherche pas à isoler les produits intermédiaires de la dégradation. En revanche, il est important de disposer d'un organisme présentant le minimum d'exigences nutritionnelles (vitamines, acides aminés etc.) et dont la composition ait une haute valeur nutritive. Cette dernière condition implique une absence de toxicité et un contenu élevé en acides aminés essentiels.

De ce point de vue, la toxicité présente souvent un problème avec les champignons cellulolytiques, dont certains produisent de violentes toxines (trichodermines); en revanche, il a été démontré que la composition en acides

aminés de Cellulomonas, bactérie cellulolytique non pathogène, correspondait aux normes de la FAO (Han & Srinivasan, 1968). Cet organisme, qui de plus ne présente d'exigences que pour la biotine et pour la thiamine (vitamine B₁), mérite donc d'être étudié, au moins en ce qui concerne la conversion de la cellulose en protéine alimentaire.

1.2. Nature du substrat cellulosique (Cowling, 1975)

La cellulose est un polymère linéaire de longueur variable, comprenant jusqu'à plus de 10 000 sous-unités glucose reliées entre elles par des liaisons glucosidiques β -1,4. Ce polymère, insoluble, est à l'état naturel assemblé en microfibrilles composées de plusieurs dizaines de chaînes et présentant des régions cristallines alternant avec des régions moins ordonnées.

Dans la paroi secondaire des cellules végétales, ces microfibrilles sont arrangées parallèlement en couches superposées ayant chacune une orientation différente. Sauf dans certains cas comme celui des fibres de coton qui sont constituées à 90 % par de la cellulose pure, la cellulose est généralement associée à deux autres catégories de substances :

- Les hémicelluloses, constituées d'hétéropolymères ramifiés, comprenant des résidus glucose, xylose, galactose, mannose, arabinose ainsi que des acides uroniques.
- La lignine, polymère tridimensionnel complexe et très résistant à l'attaque enzymatique, constituée de phénols fortement substitués, en particulier l'alcool coniférylique et l'alcool syringylique.

1.3. Mécanismes de dégradation

L'ensemble de la structure décrite ci-dessus rend la cellulose à l'état naturel très peu accessible à une attaque enzymatique, étant donné que les cellulases ne peuvent que très difficilement y diffuser pour atteindre leur substrat. Ce problème est résolu chez les organismes cellulolytiques grâce à un système enzymatique complexe, permettant, en plus de la dégradation éventuelle de la lignine et des hémicelluloses, une digestion des régions cristallines de la cellulose. Certains traitements industriels, tels que le broyage mécanique ou le traitement à la vapeur, à l'alcali ou à l'acide, peuvent également rendre la cellulose plus accessible et améliorer sa dégradabilité.

Les organismes cellulolytiques les mieux étudiés actuellement sont trois champignons : Sporotrichum pulverulentum, Trichoderma viride et Trichoderma lignorum. Leur système enzymatique est relativement similaire et comporte les composants suivants :

- Des endo-glucanases, dont l'action s'exerce au hasard tout au long des chaînes cellulosiques; ces enzymes sont généralement beaucoup plus actives sur les dérivés solubles comme la carboxyméthylcellulose (CMC) que sur les celluloses hautement structurées et insolubles comme dans le coton (Eriksson & Pettersson, 1975 a, Berghem, Pettersson & Axjö-Frederiksson, 1976).
- Une ou plusieurs exo-glucanases, qui libèrent des résidus cellobiose à partir de l'extrémité des polymères. Ces enzymes sont pratiquement inactives vis-à-vis de la CMC, sans doute parce qu'elles sont bloquées dès qu'elles rencontrent

un résidu carboxyméthylé (Eriksson & Pettersson, 1975 b, Berghem & Pettersson, 1973, Wood & McCrae, 1972, Halliwell & Griffin, 1973).

- Une ou plusieurs β -glucosidases, qui hydrolysent le cellobiose et les cellodextrines de faible poids moléculaire (Eriksson & Pettersson, 1975 a, Wood & McCrae, 1972, Halliwell & Griffin, 1973, Berghem & Pettersson, 1974).

Ces trois composants exercent les uns vis-à-vis des autres un synergisme prononcé, qui a conduit à proposer le mécanisme suivant (Eriksson & Pettersson, 1975 b, Halliwell & Griffin, 1973, Berghem, Pettersson & Axiö-Frederiksson, 1975, Wood, 1975) :

La première étape consiste en une attaque de la cellulose par les endo-glucanases, probablement sur les sites où la structure cristalline des microfibrilles est disloquée. Cette hydrolyse crée des sites réactifs pour les exo-glucanases, qui peuvent achever de digérer les fibres, y compris dans les régions cristallines. Le rôle des cellobiases ou β -glucosidases et d'éviter l'accumulation du cellobiose, dont l'action inhibitrice sur les exo-glucanases a été démontrée (Halliwell & Griffin, 1973).

Outre la dégradation purement hydrolytique, deux autres types de mécanismes ont été mis en évidence chez divers organismes :

- a) La phosphorylyse : ce mécanisme est avantageux d'un point de vue énergétique puisqu'il fournit directement des sucres phosphorylés, économisant ainsi l'ATP nécessaire à la mobilisation du glucose. Une cellodextrine phosphorylase a

été purifiée chez Clostridium thermocellum, de même qu'une cellobiose phosphorylase (Alexander, 1968, Seth & Alexander, 1969); ce dernier type d'enzyme a également été mis en évidence chez plusieurs autres bactéries dont Cellulomonas (Sato & Takahashi, 1967) et chez un champignon, Fomes annosus (Hüttermän & Volger, 1973).

- b) La dégradation oxydative : chez Sporotrichum pulverulentum, il existe une cellobiose-quinone oxydoréductase (Westermarck & Eriksson, 1975) oxydant le cellobiose en cellobiono- δ -lactone et des oxydases capables d'oxyder les résidus glucose du coton en acides gluconiques et glucuroniques (Eriksson, Pettersson & Westermarck, 1974). D'autre part, Eriksson, Pettersson & Westermarck (1974) ont également pu montrer que la digestion de la cellulose par les filtrats concentrés de cultures de Sporotrichum pulverulentum s'accompagne d'une rapide consommation d'oxygène. Sous atmosphère d'azote en absence d'oxygène, la dégradation de la cellulose par ces mêmes filtrats est beaucoup moins extensive. Le même phénomène a été observé pour plusieurs autres champignons cellulolytiques. Les auteurs ont suggéré que le rôle de cette oxydation était de créer des groupes acides chargés négativement qui disloqueraient la structure ordonnée de la cellulose et la rendraient plus accessible aux enzymes hydrolytiques.

Pour terminer, il faut mentionner que certains champignons, en particulier ceux responsables de la carie brune (brown rot) comme Poria monticola ou Lenzites trabea,

semblent utiliser un système basé sur la dégradation de la cellulose par l'eau oxygénée en présence d'ions Fe^{2+} (Koenigs, 1975). Ces réactifs sont capables d'attaquer le bois par une action synergique se caractérisant par des effets similaires à ceux observés lors de la dégradation du bois par les champignons en question. Dans les deux cas, on constate une baisse très rapide du degré de polymérisation de la cellulose résiduelle (non solubilisée) dès le début de la réaction. Le même phénomène s'observe lors de l'hydrolyse acide, mais non lors de l'attaque par les champignons responsables de la carie blanche (Polyporus versicolor). De plus, un assez fort pourcentage de la cellulose résiduelle devient soluble dans l'alcali, ce qui est également le cas avec les champignons de la carie brune, mais pas avec ceux de la carie blanche ni avec l'hydrolyse acide. De même, l'eau oxygénée et les ions Fe^{2+} attaquent préférentiellement les hémicelluloses, ce qui correspond également aux observations faites avec les champignons de la carie brune. On a pu montrer par ailleurs que ceux-ci produisent des quantités appréciables d'eau oxygénée. L'intérêt de ce mécanisme est que l'eau oxygénée et les ions Fe^{2+} peuvent diffuser facilement à l'intérieur des capillaires de la paroi cellulaire végétale, alors que les enzymes cellulolytiques, du fait de leur taille, en sont largement exclues.

1.4. Localisation des enzymes

La nature de la cellulose, étant macromoléculaire et insoluble, pose le problème de la localisation des enzymes chargées de sa dégradation. Cette question a été plus particulièrement étudiée chez Cellvibrio fulvus (Berg, 1975) et chez Pseudomonas fluorescens (Yamane et al., 1971). Il est

possible de distinguer deux types de localisation : le premier comprend les enzymes extracellulaires, obtenues à partir du milieu de culture après filtration ou centrifugation des bactéries et le second les enzymes liées d'une manière ou d'une autre aux cellules. Cette catégorie peut elle-même être subdivisée en plusieurs compartiments définis par fractionnement cellulaire :

- L'activité intramurale (périplasmique) est constituée des enzymes situées entre la paroi externe et la membrane cytoplasmique; cette activité peut être détachée des bactéries en les transformant en sphéroplast, c.-à-d. en détruisant sélectivement la partie rigide de leur enveloppe.
- L'activité cytoplasmique est obtenue dans le surnageant après lyse et centrifugation des sphéroplast.
- L'activité liée à des membranes peut être mise en évidence dans les culots obtenus après lyse et centrifugation des débris membranaires.

1.5. Régulation

L'impossibilité pour la cellulose de pénétrer dans les cellules signifie que pour réguler la production de cellulase, les organisme cellulolytiques doivent avoir recours à des systèmes ne nécessitant pas d'interaction directe entre le substrat et un effecteur intracellulaire, et par conséquent différents de ceux qui ont été le plus étudiés jusqu'à présent tels que l'opéron lactose d'Escherichia coli par exemple (pour une revue de ce sujet, voir The Lactose Operon, 1970).

La régulation de l'activité cellulolytique peut varier selon sa localisation, les enzymes extracellulaires

étant généralement soumises à un contrôle beaucoup plus strict que les enzymes liées aux cellules. Chez Pseudomonas fluorescens, par exemple, trois enzymes ont été caractérisées, dont l'une est semi constitutive et confinée dans le cytoplasme et l'espace intramural, tandis que les deux autres, strictement régulées, sont sécrétées à l'extérieur des cellules lorsque les conditions d'induction sont remplies (Yamane et al., 1971).

2. Plan des travaux effectués

Etant donné l'absence quasi totale de données concernant la souche de Cellulomonas que j'ai étudiée, j'ai utilisé une approche polyvalente, en tentant d'éclairer plusieurs aspects du système. En gros, les données présentées dans ce travail peuvent être ordonnées en trois parties :

- a) Une brève caractérisation générale de la bactérie, comprenant sa classification taxonomique et ses propriétés de croissance.
- b) Une étude de l'activité β -glucosidase et du métabolisme du cellobiose. L'activité β -glucosidase, intracellulaire, a été fractionnée en deux enzymes différant par leur régulation et leur propriétés enzymatiques. Le rôle du métabolisme du cellobiose a été étudié en analysant le phénotype de mutants incapables d'utiliser le cellobiose ou la cellulose.
- c) Une investigation de l'activité cellulolytique. Cette activité a été étudiée quant à sa localisation et sa régulation; de plus quatre cellulases distinctes ont été identifiées et trois d'entre elles purifiées.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Souches

La bactérie cellulolytique IIbc, identifiée comme appartenant au genre Cellulomonas, vient du laboratoire de M. Ibarra à l'université de la Havane (Cuba). Les expériences décrites dans ce travail ont été effectuées avec un mutant de cette souche résistant à la streptomycine et à la kanamycine afin de pouvoir constater l'authenticité et l'absence de contamination des cultures, en particulier pour les mutants du système cellulolytique.

2. Conditions de culture

Cellulomonas peut être cultivée sans problème à 30 ou 37° C en L-broth, en tryptone ou en milieu minéral M9 (Miller, 1972) complémenté avec 2 µg/ml de biotine, 1 µg/ml de vitamine B₁ et une des sources de carbone suivantes : glycérol 0,5 %, glucose 0,2 %, cellobiose 0,2 %, acétate de sodium 50 mM, poudre de cellulose Whatman CF 11 2,5 % (poids/vol.). Les souches ont été conservées sur boîtes L ou tryptone à 4° C et restriées tous les 3 ou 4 mois.

3. Produits chimiques

La nitrosoguanidine, la rifampicine, la glucono- δ -lactone, le Tris et l'AMP cyclique ont été obtenus chez Sigma, le p-nitrophényl- β -glucoside (PNPG) et le cellobiose chez Calbiochem, la poudre de cellulose (CF 11) et la DEAE-cellulose (DE 52) chez Whatman, le Sephadex G-25 et G-200, le DEAE-Sephadex A-50, le Con A-Sepharose et l'AH-Sepharose 4B chez Pharmacia. La carboxyméthylcellulose soluble (CMC) provient de Fluka, le sophorose de Roth, l'agar, la tryptone et l'ex-

trait de levure de Difco, le dodécylsulfate de sodium (SDS) de Serva, l'ampicilline de Mycofarma, le Biogel P-150 de Bio-Rad, la glucose-oxydase (grade I) et la peroxydase de Boehringer, l'acrylamide et la bisacrylamide de Kodak. Le pyruvate de sodium ($2\text{-}^{14}\text{C}$, $33\text{ }\mu\text{Ci/ml}$) a été obtenu chez New England Nuclear (NEN). La résine de valine-Sepharose a été préparée par Yves Marco selon la méthode de Cuatrecasas (1970). Tous les autres produits ont été obtenus chez Merck ou chez Fluka et étaient de pureté analytique, sauf le chlorhydrate de guanidine (Fluka purum).

4. Préparation de gluconolactone-Sepharose

25 g d'AH-Sepharose 4B sont lavés d'abord avec 500 ml de chlorure de sodium 0,5 M, puis avec de l'eau jusqu'à disparition du chlorure de sodium. La résine est resuspendue dans 16 ml d'eau et le pH ajusté à 4. 0,975 g de gluconolactone, puis 0,1 g de 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide-HCl sont ensuite et le pH ajusté à 5,7. Le mélange est agité pendant 1 h en maintenant le pH entre 4,5 et 6, puis pendant une nuit, après quoi le pH est ajusté à 5. Le processus est répété pendant deux fois 24 h. La résine est alors resuspendue dans de l'eau (volume total 25 ml) et 0,5 ml d'anhydride acétique sont ajoutés. Après sonication pendant 10 min., la gluconolactone-Sepharose est filtrée, puis lavée et resuspendue dans de l'eau. Ni l'efficacité du couplage, ni celle du blocage des résidus aminohexyles restants n'ont été déterminées.

5. Méthodes analytiques

5.1. Mesure de la croissance en présence de cellulose

Un échantillon de culture est centrifugé pendant

12 s à 2000 trs/min. dans une centrifugeuse clinique (Sorvall GLC-1) afin de séparer la cellulose des bactéries. La concentration des bactéries est estimée en mesurant la densité optique du surnageant à 600 nm.

5.2. Dosage de l'activité β -glucosidase

L'activité dans les cultures en milieu M9 est mesurée en incubant un aliquote de culture toluénisée à 37° C en présence de PNPG 10^{-3} M. La réaction est terminée par adjonction de 0,5 volume de carbonate de soude 1 M. Les débris cellulaires sont centrifugés et la concentration de p-nitrophénol déterminée par lecture de l'absorbance à 400 nm en prenant comme coefficient d'extinction molaire ϵ la valeur de $1,9 \cdot 10^4$ (Lalégérie, 1974). Une unité est définie comme la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 1 μ M de PNPG par heure. L'activité dans les préparations d'enzyme est mesurée de manière similaire, en utilisant comme milieu de dosage un tampon de phosphate de potassium 0,1 M à pH 7 contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M.

5.3. Dosage de l'activité cellobiase

Ce dosage consiste à mesurer la formation de glucose à partir du cellobiose. Durant la première étape, l'enzyme est incubée en présence de cellobiose 0,01 M dans un tampon de phosphate de potassium 0,1 M à pH 7 contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M. La réaction est terminée par chauffage à 100° pendant 10 min. La quantité de glucose libérée est ensuite mesurée selon la technique de la glucose-oxydase (Huggett & Nixon, 1957). 20 μ l d'une solution de chlorhydrate d'o-dianisidine à 1,3 % dans l'éthanol à 50 % (v/v) sont rajoutés par ml de mélange d'incubation ainsi que 50 μ l d'une

solution contenant 500 $\mu\text{g/ml}$ de glucose oxydase et 200 $\mu\text{g/ml}$ de peroxydase dans le tampon décrit ci-dessus. Le tout est incubé à 37° C pendant 1 h. En cas de formation d'un précipité coloré, celui-ci est dissous en ajoutant un volume d'acétone à tous les échantillons. L'absorbance à 420 nm est ensuite mesurée en utilisant comme référence une solution de cellobiose 10^{-2} M incubée sans β -glucosidase et traitée de manière identique pour le dosage du glucose. La quantité de glucose est estimée d'après une courbe d'étalonnage effectuée avec des concentrations connues de glucose. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 1 μM de cellobiose/h.

5.4. Dosage de l'activité cellulase soluble

Un aliquote provenant soit d'une culture centrifugée, débarrassée de la cellulose et des bactéries, soit d'une préparation d'enzyme est incubé avec de la CMC dissoute dans le milieu M9 (concentration finale 0,5-1 %). La réaction est terminée par chauffage à 100° C pendant 10 min. La quantité de sucres réducteurs formés par l'hydrolyse de la CMC est mesurée selon la méthode de Somogyi (1952). Le précipité dû à la présence de CMC qui se forme lors de l'adjonction du réactif de Nelson (Nelson, 1944) est centrifugé et l'absorbance du surnageant mesurée à 600 nm, après dilution dans 4 volumes d'eau si nécessaire. La quantité de sucres réducteurs est estimée d'après une courbe standard de glucose. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme capable de produire l'équivalent de 1 $\mu\text{g/h}$ de glucose.

5.5. Activité liée à la cellulose

La cellulose du milieu de culture est lavée 3 ou

4 fois dans du tampon BU. Ce traitement permet d'éliminer les enzymes solubles contenues dans le surnageant ainsi que la plupart des bactéries. 50 mg de pâte cellulosique drainée sont ensuite incubés à 37° C avec 1 ml de CMC 1 % (poids/vol.) dissoute en milieu M9. Après arrêt de la réaction à 100° C pendant 10 min., la cellulose est centrifugée et 0,5 ml du surnageant dosé comme décrit ci-dessus pour les sucres réducteurs. Le poids de cellulose sèche présent dans la pâte cellulosique utilisé pour la réaction est déterminé en pesant un autre aliquote de la même pâte avant et après séchage extensif à 110° C. Ceci permet d'exprimer l'activité en unités/g de cellulose sèche, qui peuvent être converties en unités/ml de culture ou en unités/D.O._{600 nm} de bactéries, en connaissant la quantité de cellulose ajoutée au départ et en négligeant la solubilisation de celle-ci.

5.6. Mesures de viscosité

Ces mesures ont été effectuées en utilisant comme substrat une solution de CMC obtenue après centrifugation d'une solution de CMC à 1 % en M9, ceci afin d'éliminer la pâte hétérogène présente sinon dans le milieu de dosage.

Après arrêt de la réaction à 100° C et équilibration à température ambiante, la viscosité relative du mélange d'incubation est déterminée en mesurant le temps d'écoulement de celui-ci entre deux marques dans une pipette de Pasteur finement étirée et en le comparant à celui de l'eau.

5.7. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée soit par mesure de l'absorbance à 280 nm et en l'exprimant comme telle, soit par le dosage de Lowry et al. (1951) en utilisant

l'albumine de sérum de boeuf comme standard.

5.8. Concentration en sels

La concentration en sels des fractions éluées à partir de colonnes est estimée en mesurant la conductivité d'une dilution appropriée.

5.9. Gels SDS dénaturants

L'électrophorèse sur gels plats de polyacrylamide en présence de SDS a été effectuée selon Lämmli (1970). Les gels sont colorés soit pour les protéines au bleu de Coomassie, soit pour les hydrates au periodate-Schiff selon Fairbanks, Steck & Wallach (1971). Les déterminations de poids moléculaire ont été faites sur un gel contenant 10 % d'acrylamide, en utilisant comme standards la β -galactosidase, la phosphorylase A, l'albumine de sérum de boeuf, l'ovalbumine et la DNase I.

5.10. Gels non dénaturants

L'électrophorèse est effectuée sur gels de polyacrylamide en tube, en utilisant le système de tampon de Lämmli (1970), mais en omettant le SDS et le mercaptoéthanol ainsi que le chauffage de l'échantillon. Les gels sont soit colorés au bleu de Coomassie, soit découpés dans un coupeur de gels Gilson. Les tranches de gel broyées sont collectées dans des flacons contenant 0,5 ml d'eau et élués pendant une nuit à 4° C. Des aliquotes de chaque fraction éluee sont dosés pour l'activité enzymatique, permettant de comparer le profil d'activité avec les bandes de protéines obtenues sur un gel parallèle coloré.

6. Génétique

6.1. Mutants incapables de pousser sur cellobiose (clb⁻)

6.1.1. Mutagenèse

20 µg/ml de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sont ajoutés à une culture exponentielle croissant à 30° C en milieu LB contenant 0,2 % de glucose. Après 30 min. d'incubation à 30° C, un échantillon de la culture est dilué 1000 fois en M9 + 0,2 % glucose et réincubé jusqu'à saturation de la culture.

6.1.2. Sélection à l'ampicilline

Les bactéries sont centrifugées, lavées dans du tampon BU, puis inoculées dans du milieu M9 + 0,2 % cellobiose. Une fois la croissance démarrée, 50 µg/ml d'ampicilline sont ajoutés et la culture incubée pendant 20 h. à 30° C. Les bactéries sont centrifugées, réinoculées en M9-glucose et le processus répété une fois de plus.

6.1.3. Sélection par répliques sur boîtes cellobiose

Les cultures mutagenisées et sélectionnées à l'ampicilline sont étalées sur des boîtes tryptone de façon à pouvoir isoler des colonies. Les colonies sont ensuite repiquées en grille sur des boîtes M9 + 0,2 % glucose et répliquées sur des boîtes + 0,2 % cellobiose. Les colonies ne poussant pas sur cellobiose sont purifiées sur des boîtes tryptone et retestées sur des boîtes cellobiose.

6.2. Mutants incapables de pousser sur cellulose (cls⁻)

Après mutagenèse à la nitrosoguanidine comme décrit ci-dessus, les bactéries sont étalées sur des boîtes tryptone, repiquées en grille sur des boîtes M9 + 0,2 % gluco-

se et répliquées sur des boîtes M9 sans sucre recouvertes d'une rondelle de papier buvard stérile. Les colonies ne donnant pas de tache jaune sur le buvard sont purifiées et retestées plusieurs fois sur des boîtes M9 buvard; le test final est effectué en comparant le taux de croissance des mutants avec celui du type sauvage en liquide, soit en présence de cellulose, soit en présence de glucose ou de cellobiose.

6.3. Révertants des mutants incapables d'utiliser le cellobiose

$1-5 \cdot 10^8$ cellules d'une culture de mutant lavée et resuspendue en tampon BU sont étalées sur une boîte M9 contenant soit 0,2 % de cellobiose, soit 1 % de CMC. Les quelques colonies qui poussent sont purifiées avant d'être caractérisées.

6.4. Mutants résistants aux antibiotiques

Le mutant résistant à la streptomycine a été sélectionné sans mutagenèse et purifié sur des boîtes tryptone contenant 200 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate de streptomycine. La mutation confère une résistance croisée à la kanamycine.

Les mutants résistants à la rifampicine (rif^r) ont été sélectionnés sans mutagenèse et purifiés sur des boîtes tryptone contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicine.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Propriétés du système

1.1. Taxonomie

La souche cellulolytique IIBC, dont l'étude a fait l'objet de ce travail, a été identifiée par le Dr. A. Roupas, de l'Institut d'hygiène (Béguin, Roupas et Eisen, soumis à J. Gen. Microbiol.). La similitude observée entre les caractéristiques d'une souche de Cellulomonas provenant d'une collection officielle (ATCC 484) et celles de IIBC permettent d'attribuer IIBC au genre Cellulomonas. Le problème de la détermination de l'espèce est supprimé par le fait que toutes les distinctions qui avaient été faites auparavant à l'intérieur du genre Cellulomonas ont été supprimées et que Cellulomonas flavigena est actuellement la seule espèce reconnue (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974). Cette espèce de bactéries, apparentée aux Corynebactéries, regroupe plusieurs souches cellulolytiques faiblement Gram positives ou Gram négatives, ayant un métabolisme principalement respiratoire et généralement isolées à partir du sol.

Au microscope, on observe des bâtonnets souvent agrégés en amas de taille variable, pouvant la forme en "caractères chinois" typique des Corynebactéries.

Les colonies sur agar sont lisses et présentent une coloration jaune non diffusible dont l'intensité varie selon la composition du milieu.

1.2. Taux de croissance

Le temps de génération de la souche IIBC (Cellulomonas flavigena) a été déterminé pendant la croissance en

Table 1 : Temps de génération de la souche IIbc (Cellulomonas flavigena) en présence de diverses sources de carbone

Source de carbone	Temps de génération (minutes)
Glucose 0,2 %	190
Glycérol 0,435 %	190
Glycérol 0,0217 %	190
Cellobiose 0,2 %	190
CMC 1 %	240
Cellulose 2,5 %	400-450
Na-Acétate 50 mM	700-800

Les cellules ont été cultivées avec agitation à 37° C en milieu minéral M9 contenant 1 µg/ml de vitamine B₁, 2 µg/ml de biotine et les sources de carbone indiquées. La croissance a été suivie en mesurant la densité optique à 600 nm et le temps de génération déterminé à partir de la phase de croissance exponentielle.

milieu minéral M9 contenant comme source de carbone de l'acétate, du glycérol, du glucose, du cellobiose, de la CMC ou de la cellulose. Les résultats sont donnés dans la table 1. La croissance est maximale en glucose, cellobiose et glycérol. Le fait d'abaisser la concentration en glycérol n'affecte pas le temps de génération, mais provoque un arrêt de la croissance à une densité de cellules moindre (voir plus loin, effet du pyruvate). La croissance en cellulose est beaucoup plus lente qu'en présence de glucose ou même de CMC, probablement parce que l'hydrolyse de la cellulose est un facteur limitant. La croissance en acétate est très lente mais détectable.

2. Métabolisme des β -glucosides

Chez la plupart des organismes cellulolytiques, le cellobiose, produit direct de la dégradation de la cellulose, est métabolisé de manière distincte de celle-ci. Les enzymes clivant le cellobiose (β -glucosidases ou cellobiases) sont généralement inactives vis-à-vis de la cellulose macromoléculaire et actives vis-à-vis d'autres β -glucosides comme le PNPG. Leur localisation, ainsi que leur régulation, diffèrent également de celles des cellulases. Pour ces raisons, il était intéressant d'étudier cet aspect du système cellulolytique de Cellulomonas flavigena.

2.1. Dosage

La variation d'activité observée dans les cellules en fonction du pH est décrite dans la figure 1. Le maximum d'activité se situe autour de pH 7. Le dosage n'est pas affecté par la présence ou l'absence de magnésium, d'EDTA ou de mercaptoéthanol; en revanche, le remplacement du phos-

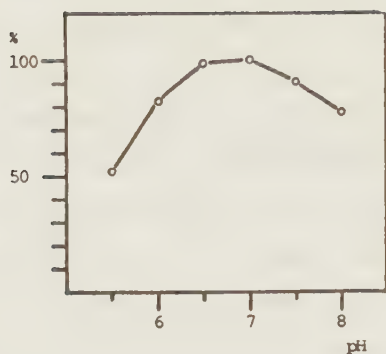


Figure 1 : Variation de l'activité β -glucosidase en fonction du pH.

Des aliquotes de 0,1 ml d'une culture en M9 + 0,2 % cellobiose ont été incubés en présence de PNPG 10^{-3} M dans 0,9 ml de tampon phosphate 0,1 M dont le pH avait été ajusté en variant la proportion de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 (Handbook of Biochemistry). Le tampon contenait en outre du chlorure de potassium 10 mM, du sulfate de magnésium 1 mM et du mercaptoéthanol 0,27 %. La réaction a été stoppée par addition de 0,5 ml de carbonate de sodium 1 M. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité maximum.

phate par du Tris-HCl diminue l'activité de 4 à 5 fois. Cette observation pourrait s'expliquer en supposant que le clivage du PNPG a lieu par phosphoryse.

Ces résultats concernent l'activité globale, constituée de la somme des activités de deux enzymes différentes (voir ci-dessous), le comportement individuel de ces deux enzymes en fonction des conditions de dosage n'étant pas forcément identique à celui de l'activité globale.

2.2. Localisation de l'activité β -glucosidase

L'activité est entièrement liée aux cellules (le surnageant d'une culture en cellobiose contient moins de 2 % de l'activité totale de la culture). L'activité des bactéries est stimulée trois fois par un traitement au toluène et peut être solubilisée par traitement des bactéries aux ultra-sons. Ce type de localisation est courant chez les bactéries cellulolytiques (Yamane et al., 1971, Hân & Srinivasan, 1969). Chez les champignons cellulolytiques comme Trichoderma ou Sporotrichum, l'activité β -glucosidase est au contraire relâchée dans le milieu (Eriksson & Pettersson, 1975 a, Berghem & Pettersson, 1974).

2.3. Séparation et caractérisation des β -glucosidases I et II

Le dosage au PNPG a été utilisé au cours de toutes les purifications.

2.3.1. Préparation de l'extrait brut

Les bactéries ont été cultivées à 37° C en M9 + 0,2 % glucose dans un fermenteur de 10 l avec agitation et aération forcée. La culture ayant atteint une densité optique (600 nm) de 1,9, les cellules ont été centrifugées dans une centrifugeuse Sharples à flux continu. La pâte de bactéries

obtenue (20 g) a été resuspendue dans environ 40 ml de tampon phosphate de potassium 0,05 M à pH 7 contenant du sulfate de magnésium 0,01 M (tampon I). La suspension a ensuite été passée à la French press pour casser les cellules et le jus obtenu centrifugé pendant 2 h. à 300 000 g. Le surnageant clair (40 ml) a été prélevé et dialysé contre du tampon I après adjonction d'une pointe de spatule de DNase I (Worthington).

2.3.2. Colonne de DEAE-cellulose

L'extrait brut dialysé, contenant 2360 unités de D.O._{280 nm} (table 2) a été chargé sur une colonne de 170 ml de DEAE-cellulose équilibrée avec du tampon I. Après lavage avec 300-350 ml de tampon I, la colonne a été éluée avec un gradient exponentiel allant de 0,05 à 0,6 M en phosphate de potassium à pH 7, en collectant des fractions de 10-11 ml. Le profil d'élution obtenu est montré dans la figure 2. Comme on peut le voir, le matériel présente une forte densité optique à 600 nm, probablement due à la présence d'acides nucléiques qui n'ont pas été éliminés par le traitement à la DNase suivi de dialyse. L'activité est éluée en deux pics qui ont été rassemblés en deux pools distincts. La β -glucosidase éluée la première est désignée par la suite sous le nom d'enzyme I, celle éluée à plus haut sel sous le nom d'enzyme II.

2.3.3. Colonne de Biogel P-150

Après concentration sur membrane ultrafiltrante (Amicon PM 10), les deux enzymes ont été passées sur une colonne de Biogel P-150 (2,5 x 50 cm) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,0625 M à pH 6,8 contenant du sulfate de magnésium

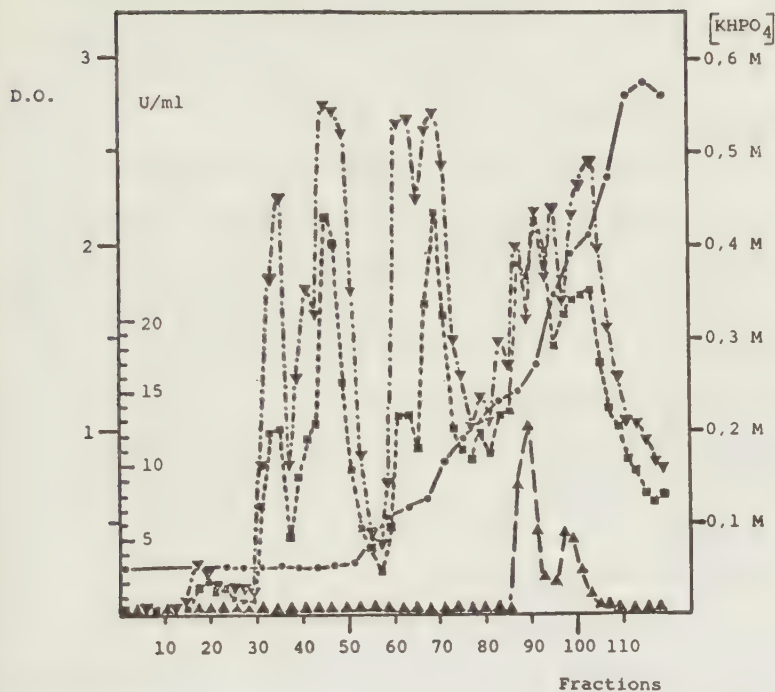


Figure 2 : Profil d'élution des β -glucosidases d'un extrait brut chargé sur une colonne de DEAE-cellulose et élué comme décrit dans matériel et méthodes.

▲ — — — ▲ , activité; ● — — — ● , concentration en phosphate; ■ — — — ■ , densité optique à 280 nm; ▼ — — ▼ , densité optique à 260 nm.

10^{-3} M en collectant des fractions de 4-4,5 ml. Les profils d'élution des enzymes I et II sont montrés dans les figures 3 et 4.

2.3.4. Colonne de valine-Sephrose

Ce type de chromatographie, de développement assez récent, permet de séparer les protéines sur la base de leur caractère plus ou moins hydrophobe (Rimerman et Hatfield, 1973, Memoli et Doellgast, 1975). En présence d'un sel augmentant la polarité de l'eau, comme le sulfate d'ammonium, les régions lipophiles des protéines ont une forte affinité pour les résidus non polaires de valine fixés sur la résine. L'abaissement progressif de la concentration en sulfate d'ammonium permet d'éluer sélectivement les protéines par ordre croissant d'hydrophobicité.

La concentration en sel des enzymes I et II a été ajustée à 1,5 M en sulfate d'ammonium et 0,1 M en phosphate d'ammonium à pH 7. Les β -glucosidases I et II, contenant respectivement 29 et 8,5 unités de D.O._{280 nm} de protéines (table 2), ont ensuite été chargées sur une colonne de valine-Sephrose (1,9 x 17 cm) équilibrée avec un tampon de phosphate de potassium 0,1 M (pH original : 7) contenant du sulfate d'ammonium 1,5 M (le pH n'a pas été ajusté après adjonction du sulfate d'ammonium). Après lavage de la colonne avec le même tampon, les enzymes ont été éluées avec un gradient exponentiel étalé sur 120 ml pour l'enzyme I et sur 240 ml pour l'enzyme II, en utilisant comme tampon final du Tris-HCl 0,0625 M à pH 6,8 contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M. Les profils d'élution des β -glucosidases I et II sont montrés dans les figures 5 et 6.

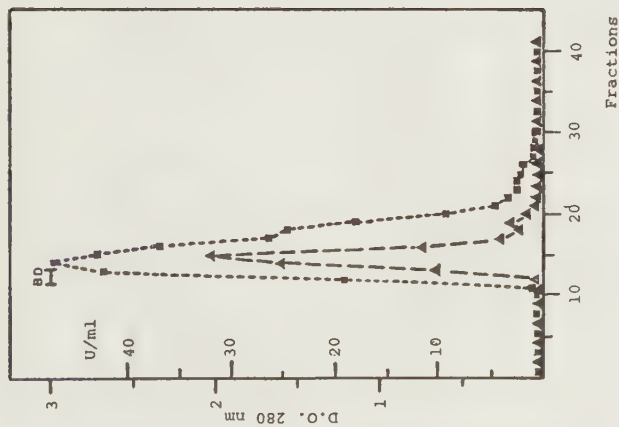


Figure 3 : Filtration sur Biogel P-150 de la β -glucosidase I issue de la colonne de DEAE-cellulose.

BD, bleu dextrane. (volume exclus), Δ --- Δ , activité; $\blacksquare$ ----- $\blacksquare$, densité optique à 280 nm.

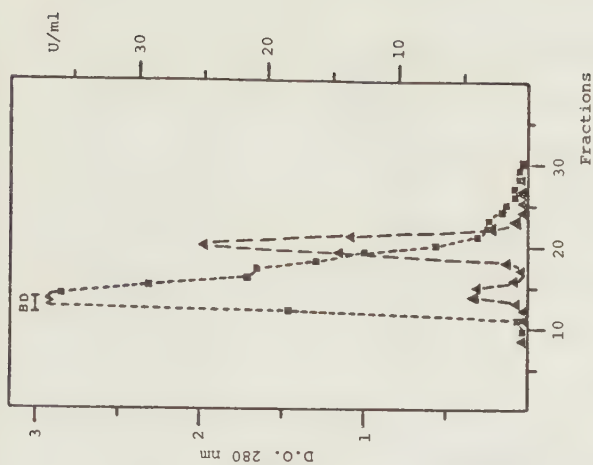


Figure 4 : Filtration sur Biogel P-150 de la β -glucosidase II issue de la colonne de DEAE-cellulose.

BD, bleu dextrane (volume exclus); Δ --- Δ , activité; $\blacksquare$ ----- $\blacksquare$, densité optique à 280 nm.

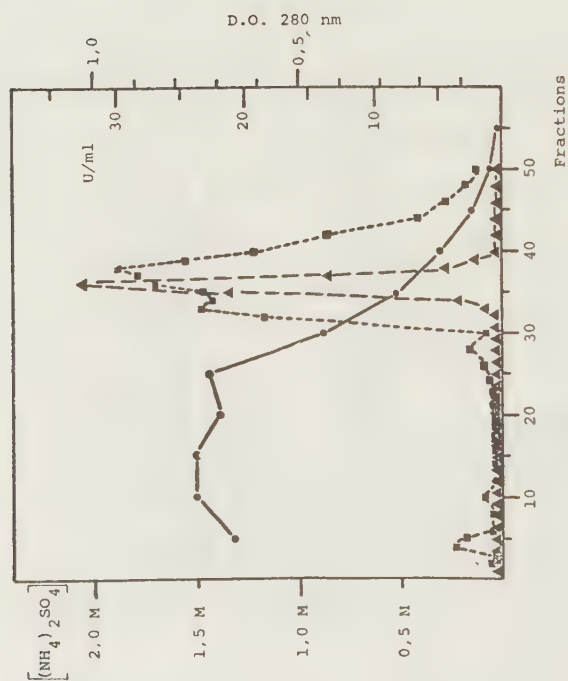


Figure 5 : Chromatographie hydrophobique de la β -glucosidase I sur colonne de valine-Sepharose.
 ●—, concentration en sulfate d'ammonium; ▲—, activité; ■—, densité optique à 280 nm.

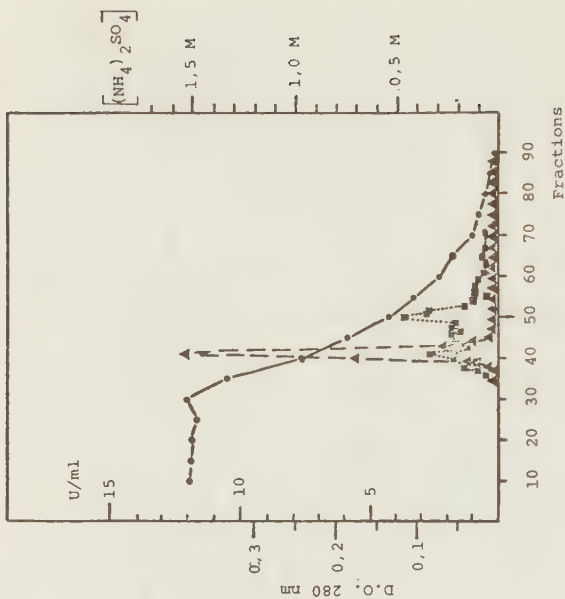


Figure 6 : Chromatographie hydrophobique de la β -glucosidase II sur colonne de valine-Sepharose.
 ●—, concentration en sulfate d'ammonium; ▲—, activité; ■—, densité optique à 280 nm.

2.3.5. Colonne de Biogel P-150 à haute force ionique

Après concentration par ultrafiltration, l'enzyme I a été soumise à une deuxième filtration sur Biogel P-150 en présence d'un tampon de phosphate de potassium 0,05 M à pH 7 contenant du chlorure de sodium 0,5 M et du nitruure de sodium 0,01 M. L'élévation de la force ionique visait à diminuer les interactions et l'agrégation des protéines afin d'obtenir une meilleure séparation. Le résultat n'est pas concluant, comme le montre la figure 7, dont le profil d'élu-tion des protéines est similaire à celui de la figure 3.

2.3.6. Colonne de gluconolactone-Sepharose

La gluconolactone est un inhibiteur connu des β -glucosidases (Sobotka & Stelzig, 1973), et son utilisation pour la chromatographie d'affinité a été tentée avec succès pour les β -glucosidases de la rate de boeuf (Kanfer et al., 1974). Des expériences préliminaires ayant montré que la gluconolactone inhibe les enzymes I et II, j'ai essayé de la fixer sur du Sepharose afin d'effectuer une chromatographie d'affinité.

Après concentration par ultrafiltration et dialyse contre un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,4 contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M et du nitruure de sodium $5 \cdot 10^{-3}$ M, les enzymes I et II, contenant respectivement 1,85 et 0,59 unités de D.O._{280 nm} en protéines (table 2), ont été chargées sur des colonnes de gluconolactone-Sepharose de 0,5 ml (pi-pette de Pasteur) équilibrées dans le même tampon. Après la-vage avec 3 ml de tampon au phosphate de potassium 0,1 M à pH 7 contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M, l'activité a été éluee avec 3 ml de tampon au phosphate de potassium 0,5 M à pH 7, contenant du sulfate de magnésium 10^{-3} M et du nitruure

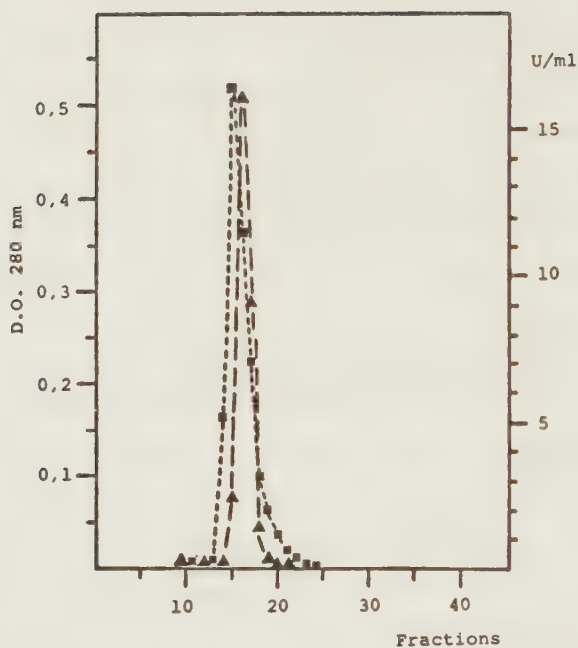


Figure 7 : Filtration de la β -glucosidase I à haute force ionique sur colonne de Biogel P-150.

▲---▲, activité; ■---■, densité optique à 280 nm.

de sodium $5 \cdot 10^{-3}$ M, en collectant des fractions de 0,5 ml. Le résultat obtenu est montré dans la figure 8. La purification est satisfaisante pour l'enzyme II, qui était déjà assez pure auparavant et qui apparaît comme une bande homogène d'un poids moléculaire d'environ 50 000 daltons. La purification de l'enzyme I est encore très incomplète, bien que plusieurs bandes disparaissent ou soient fortement diminuées après passage sur gluconolactone-Sepharose. Il est de fait probable que la résine se comporte comme un échangeur d'ion : l'activité peut être éluee à haute force ionique, mais non en présence de gluconolactone. De même, l'enzyme liée à la résine est capable d'hydrolyser le PNPG tout en restant fixée. Enfin, un colorant anionique comme le bleu dextrane s'adsorbe sur la résine. Tout ceci laisse supposer que les groupes aminohexyl présents sur l'AH-Sepharose utilisé pour coupler la gluconolactone n'ont pas été saturés, ni par la réaction de couplage, ni par la réaction de blocage à l'anhydride acétique.

2.3.7. Bilan

Le bilan de la purification des β -glucosidases I et II est montré dans la table 2. Il apparaît clairement que le rendement final est assez mauvais pour les deux enzymes. Cette purification, qui n'a été effectuée qu'une fois, pourrait sans doute être améliorée de plusieurs façons. Pour commencer, il vaudrait sans doute la peine d'utiliser des tampons plus raffinés, contenant par exemple du glycérol, des agents protecteurs des groupes thiols et éventuellement des inhibiteurs des protéases. D'autre part, la colonne de Biogel P-150 à haut sel effectuée avec l'enzyme I ne donne pas les résultats escomptés, avec une perte de 50 % et une purification de 2-2,5 fois seulement. Il serait sans doute préférable de suppri-

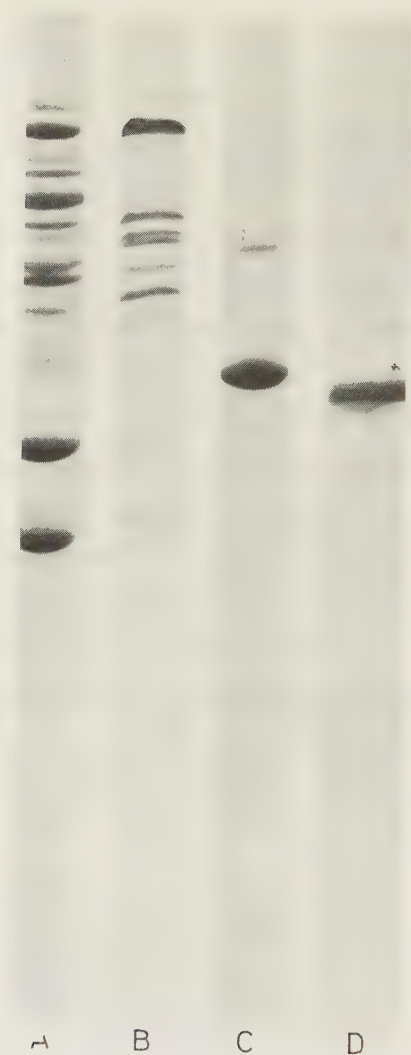


Figure 2 : Gels dénaturants à 10 % d'acrylamide des β -glucosidases avant et après la colonne de gluconolactone-Sephadex.

A et B, enzyme I avant et après la colonne de gluconolactone-Sephadex. A : 0,015 unités de D.O. 280 nm ; B : 0,005 unités de D.O. 280 nm.

C et D, enzyme II avant et après la colonne de gluconolactone-Sephadex. C: 0,005 unités de densité optique à 280 nm; D : 0,004 unités de densité optique à 280 nm.

Table 2 : Bilan de la purification des β -glucosidases

Matériel	Enzyme I				Enzyme II			
	Protéines totales D.O. 280 nm - volume total	Activité totale unités	Rende- ment	Activité spécifique unités/D.O. 280 nm	Protéines totales D.O. 280 nm - volume total	Activité totale unités	Rendement	Activité spécifique unités/D.O. 280 nm
Extrait brut avant dialyse	4700	9000	1900	100 %	0,405			
Extrait brut après dialyse	2360	4160	1240	65 %	0,525			
Effluent de la colonne de DEAE- cellulose	n.m.	635	33 %	n.m.	79	420	22 %	5,3
Effluent de la colonne de Biogel à bas sel	29	405	21,3 %	14	8,25	208	11 %	25,2
Effluent de la colonne de valine- Sephacrose	8	260	13,7 %	32,5	0,59	71,5	3,75 %	120
Effluent de la colonne de Biogel à haut sel	1,85	133	7 %	71,5	-	-	-	-
Effluent de la colonne de gluco- nolactone-Sepha- rose	0,62	97,5	5,1 %	155	0,295	58,2	3,05 %	198

mer cette étape et d'améliorer les autres. Sur ce dernier point, la résolution de la colonne de valine-Sepharose augmente très sensiblement avec l'étalement du gradient (figures 5 et 6); toutefois l'étape la plus prometteuse est sans doute la chromatographie d'affinité sur gluconolactone-Sepharose. Dans le cas présent, la réaction de couplage n'a apparemment pas marché comme prévu pour des raisons qui restent encore à déterminer; dans de bonnes conditions, ce genre de colonne devrait permettre de supprimer un certain nombre d'étapes intermédiaires.

2.3.8. Propriétés enzymatiques

2.3.8.1. Affinité pour le PNPG

Un graphique selon Lineweaver-Burke de la variation d'activité des enzymes I et II en fonction de la concentration en PNPG est montré dans la figure 9 A et B. La valeur du K_m déterminée à faible concentration est de $7 \cdot 10^{-4}$ pour l'enzyme I et de $2 \cdot 10^{-4}$ pour l'enzyme II. A haute concentration, le graphique n'est visiblement plus linéaire. Cette déviation pourrait être due entre autres à une inhibition non compétitive des enzymes par leur substrat ou par leur produit.

2.3.8.2. Inhibition par le cellobiose

L'inhibition par le cellobiose de l'hydrolyse du PNPG par les enzymes I et II est décrite dans les graphiques de la figure 10. Le comportement non linéaire des enzymes pour de hautes concentrations de PNPG complique l'analyse quantitative et en particulier la détermination du K_i . Il est cependant visible que l'effet du cellobiose est supprimé à haute concentration de PNPG et que l'inhibition est de type compétitif, comme on pouvait s'y attendre.

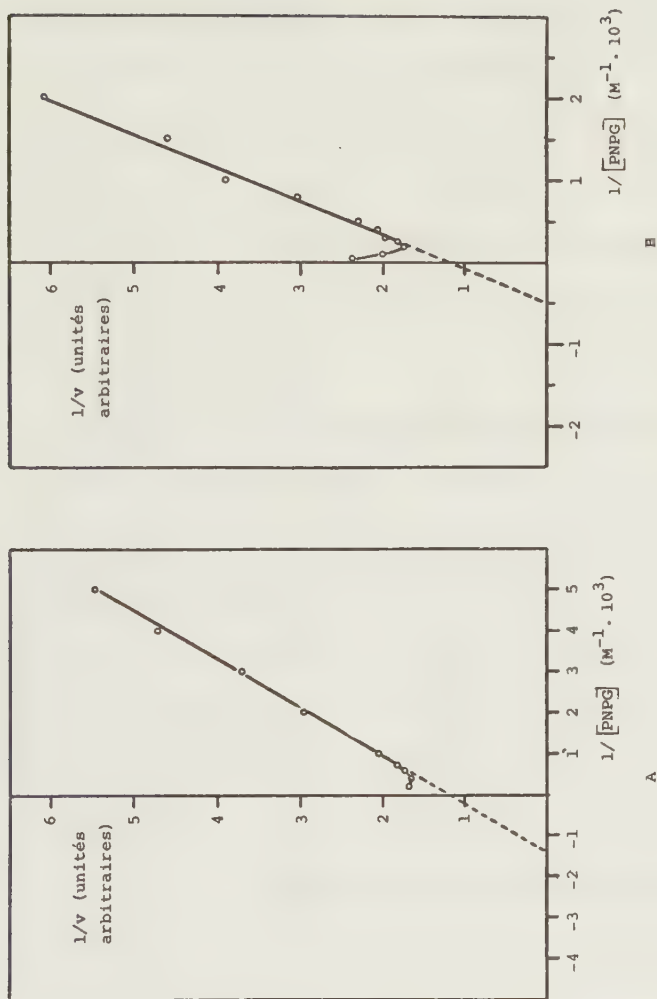


Figure 9 : Graphique réciproque de l'activité des β -glucosidases I et II en fonction de la concentration en PNPG.

A : enzyme I; B : enzyme II.

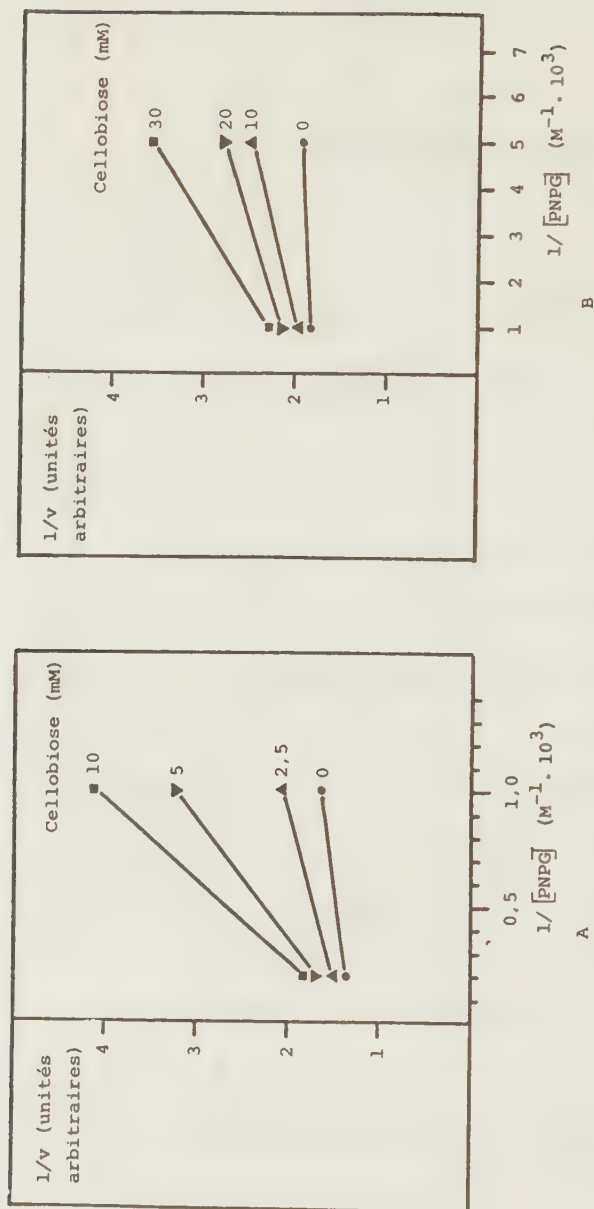


Figure 10 : Graphique réciproque montrant l'inhibition compétitive par le cellobiose de l'hydrolyse du PNPg par les β -glucosidases I et II.

A : enzyme I; b : enzyme II.

2.3.8.3. Hydrolyse du cellobiose

Le cellobiose (0,01 M) est hydrolysé par l'enzyme II à une vitesse équivalant à 75 % de celle mesurée pour l'hydrolyse du PNPG (10^{-3} M). Ce rapport serait doublé au cas où l'enzyme II serait une phosphorylase.

L'enzyme I hydrolyse le cellobiose (0,01 M) à une vitesse inférieure à 6 % de celle observée pour le PNPG.

2.3.9. Discussion

La présence chez un organisme de plus d'une β -glucosidase peut sembler surprenante. Le clivage des β -glucosides ne nécessite en effet pas d'appareil enzymatique complexe comme la digestion de la cellulose. Des cas semblables sont cependant connus, par exemple chez Saccharomyces lactis et Neurospora crassa (Herman & Halvorson, 1963, Eberhart, Cross & Chase, 1964). L'inactivité de l'enzyme I vis-à-vis du cellobiose peut être rapprochée des observations faites chez E. coli, dont certains mutants sont capables de fermenter divers β -glucosides comme la salicine et l'arbutine mais non le cellobiose. Il semble cependant que cette incapacité soit due, au moins en partie, à l'inexistence d'un système de transport efficace pour le cellobiose (Schaeffler & Malamy, 1969, Prasad & Schaeffler, 1974).

Il faut mentionner que le clivage du cellobiose peut également utiliser d'autres mécanismes que la simple hydrolyse. Le premier de ces mécanismes est la phosphorylase, qui présente l'avantage de fournir directement du glucose-1-phosphate et d'économiser ainsi une molécule d'ATP. Sato & Takahashi (1967) ont démontré la présence d'une cellobiose phosphorylase chez Cellulomonas fimi R2, et bien qu'aucun test

n'ait été effectué à ce sujet chez Cellulomonas IIbc, rien n'exclut qu'une telle activité y soit présente. La seule indication disponible à ce sujet est constituée par le fait que l'activité β -glucosidase est 4 à 5 fois plus faible en tampon Tris qu'en tampon phosphate.

D'autre part, certaines β -glucosidases possèdent également une activité transglycosylase. C'est le cas en particulier de l'aryl- β -glucosidase de Neurospora crassa (Mahadevan & Eberhart, 1964), qui, en plus de l'hydrolyse du cellobiose, effectue également le transfert de résidus glucosyl sur le carbone 6 du cellobiose, en produisant ainsi un triglucoside β -1,4, β -1,6 qui est ensuite clivé en glucose et en gentiobiose (β -1,6-glucopyranosylglucose).

2.4. Régulation

Afin de déterminer les modalités de régulation de l'activité β -glucosidase, celle-ci a été mesurée pour des cultures ayant poussé dans diverses sources de carbone. Les résultats, donnés dans la table 3, montre que la β -glucosidase totale est très peu régulée : même en présence de cellobiose, la stimulation de l'activité globale est inférieure à deux fois par rapport au glucose.

Une régulation concernant la sécrétion d'enzyme dans le milieu est difficilement concevable, étant donné qu'au contraire de l'activité cellulase, l'activité β -glucosidase présente dans les surnageants de culture est quasi nulle.

Une possibilité d'expliquer la faiblesse de l'induction serait d'invoquer un phénomène de répression catabolique par le cellobiose concurrençant l'effet inducteur de celui-ci. De fait, une telle situation s'observe pour l'induc-

Table 3 : Influence de diverses sources de carbone sur l'activité β -glucosidase

Source de carbone	Activité spécifique U/D.O. 600 nm
Glucose 0,2 %	0,141
Glucose 0,05 %	0,147
Glycérol 0,435 %	0,157
Cellobiose 0,2 %	0,228
Cellulose 2,5 %	0,150

L'activité β -glucosidase a été mesurée comme décrit dans matériel et méthodes pour des cultures en croissance exponentielle dans les milieux indiqués, après mesure de la densité optique à 600 nm et traitement au toluène.

tion des cellulases (voir ci-dessous). Il faut cependant remarquer qu'au contraire des cellulases, les β -glucosidases sont plus faiblement induites en présence de cellulose qu'en présence de cellobiose. Du moment que le cellobiose est probablement un produit intermédiaire de la dégradation de la cellulose (voir ci-dessous), il devient donc difficile d'expliquer la faiblesse de son effet inducteur par la répression catabolique puisque celle-ci est moins forte en présence de cellulose qu'en présence de cellobiose (voir ci-dessous). On ne saurait cependant écarter la possibilité qu'une concentration de cellobiose supérieure à celle présente dans les cultures en cellulose, mais inférieure à 0,2 % puisse induire plus fortement l'activité β -glucosidase.

Cette activité étant due à la présence de deux enzymes, la constitutivité apparente de l'activité globale n'exclut pas que l'une de ces enzymes soit soumise à une régulation dont l'effet serait masqué par la constitutivité de l'autre. Pour tester cette hypothèse, le rapport des activités des enzymes I et II a été examiné après séparation de celles-ci par filtration sur gel pour des bactéries ayant poussé soit en glucose, soit en cellobiose. La table 4 montre que le faible accroissement de l'activité globale est dû principalement à l'accroissement de l'enzyme II, alors que l'enzyme I reste pratiquement constante. Il est intéressant de noter que l'enzyme II est précisément l'enzyme active vis-à-vis du cellobiose, alors que l'enzyme I ne l'est que très faiblement ou pas du tout.

Un exemple semblable de deux β -glucosidases régulées de manière distincte se présente chez Neurospora cras-

Table 4 : Proportion des β -glucosidases I et II dans un extrait brut après croissance des bactéries en glucose ou en cellobiose

		Croissance en glucose 0,2 %	Croissance en cellobiose 0,2 %
Activité totale U/D.O. 600 nm		0,141	0,228
Enzyme I	% du total	59 %	41 %
	Activité spécifique U/D.O. 600 nm	0,083	0,093
Enzyme II	% du total	41 %	59 %
	Activité spécifique U/D.O. 600 nm	0,058	0,135

Un extrait centrifugé de cellules soniquées ayant poussé soit en glucose, soit en cellobiose, a été passé sur une colonne de Sephadex G-100 équilibrée avec le tampon suivant : KHPO_4 0,1 M pH 7, MgSO_4 10^{-3} M, NaN_3 10^{-3} M, mercaptoéthanol 0,27 % (v/v). Le pourcentage d'activité des deux enzymes est calculé après mesure de l'activité dans les fractions du pic correspondant. L'activité spécifique est calculée en multipliant le pourcentage obtenu par l'activité spécifique totale.

sa; le groupe d'Eberhart a pu mettre en évidence chez cet organisme une aryl- β -glucosidase, induite par le cellobiose, le gentiobiose et le laminaribiose et une cellobiase, induite seulement en présence de cellobiose (Eberhart et al., 1964, Eberhart & Beck, 1973).

Un autre système analogue est également présent chez les Entérobactériacées, qui possèdent deux phospho- β -glucosidases, dont l'une est constitutive et n'hydrolyse pas la salicine et l'autre inductible et capable d'hydrolyser la salicine (Prasad & Schaeffler, 1974).

2.5. Mutants affectés dans le métabolisme du cellobiose et de la cellulose

Le rôle du métabolisme du cellobiose dans le processus de dégradation de la cellulose a été étudié à l'aide de mutants. Dans l'hypothèse où le cellobiose est un intermédiaire obligatoire, on peut prédire que les mutants ne poussant pas sur cellobiose (clb⁻) seront incapables d'utiliser la cellulose. En revanche, étant donné qu'il existe au moins une étape pour transformer la cellulose en cellobiose, il doit être possible d'inactiver cette fonction et d'obtenir ainsi des mutants ayant perdu la capacité d'utiliser la cellulose, mais gardant celle de pousser sur cellobiose. Le rôle obligatoire du cellobiose comme intermédiaire peut être vérifié en examinant le comportement de ces deux types de mutants en culture mixte avec le type sauvage. Le métabolisme du cellobiose étant intracellulaire, un mutant clb⁻ ne devrait pas pouvoir être complété par le type sauvage dans une culture mixte en cellulose, tandis qu'un mutant n'ayant pas d'activité cellulolytique mais capable d'utiliser le cel-

lobiose devrait pouvoir pousser sur cellulose si le type sauvage relâche suffisamment de cellulases dans le milieu.

2.5.1. Mutants incapables de pousser sur cellobiose (*clb*⁻)

Le métabolisme du cellobiose étant intracellulaire, l'obtention de ce type de mutant est facilitée par la possibilité de sélectionner à l'ampicilline en présence de cellobiose. Ceci n'est pas le cas des mutants *clb*⁺ incapables de pousser sur cellulose (*cls*⁻) pour lesquels la présence d'ampicilline dans le milieu est probablement létale, puisque dans une culture mixte en cellulose, ceux-ci sont complétés par le type sauvage, qui libère dans le milieu les cellulases nécessaires à la croissance du mutant (voir plus loin).

Onze mutants indépendants poussant sur glucose, mais non sur cellobiose, ont été obtenus.

L'activité β -glucosidase globale, mesurée avec des bactéries traitées au toluène, est donnée pour 6 mutants dans la table 5. Aucune des souches testées ne présente une activité globale fortement diminuée : la souche 15, qui a le niveau le plus faible, a encore une activité égale à 60 % de celle du type sauvage. En outre, les mutants 16 et 18 ont une activité globale trois fois supérieure à celle du type sauvage.

Afin de voir comment l'activité globale est distribuée entre les β -glucosidases I et II, des extraits des mutants 9 et 18 ont été analysés par filtration sur gel de Sephadex G-100. Ces mutants ont été choisis comme exemples de souches ayant une activité soit subnormale (9), soit supérieure-

Table 5 : Activité β -glucosidase de mutants clb⁻

Souche	Activité totale U/O.D. 600 nm	Activité de l'enzyme I		Activité de l'enzyme II	
		%	U/O.D. 600 nm	%	U/O.D. 600 nm
Type sauvage	0,141	59	0,083	41	0,058
9	0,110	57	0,063	43	0,047
15	0,085	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹
16	0,410	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹
17	0,112	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹
18	0,496	89	0,440	11	0,056
19	0,096	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹

¹ Non déterminé

L'activité totale a été mesurée comme décrit dans matériel et méthodes pour des cellules toluénisées ayant poussé sur glucose. L'activité des enzymes I et II a été mesurée et calculée après filtration d'un extrait brut sur une colonne de Sephadex G-200 comme décrit pour la table 3.

re à celle du type sauvage (18). Comme on peut le voir dans la table 5, la proportion des deux enzymes ne diffère pas de manière significative entre le mutant 9 et le type sauvage. En revanche, la proportion de la β -glucosidase I est très fortement accrue pour le mutant 18, dont l'augmentation d'activité globale est due entièrement à l'augmentation du niveau de cette enzyme.

Il est évidemment assez inattendu de ne pas trouver de mutants clb⁻ présentant une forte baisse de l'activité β -glucosidase, même s'il est clair que le métabolisme du cellobiose dépend également d'autres fonctions, comme le transport et l'accumulation de celui-ci à l'intérieur de la cellule. L'absence de tels mutants pourrait s'expliquer par l'existence de plus d'une enzyme capable de cliver le cellobiose. Dans ces conditions, seule une mutation pléiotropique ou une double mutation serait capable de supprimer suffisamment l'activité β -glucosidase pour donner un phénotype clb⁻. Jusqu'à présent, une seule enzyme capable d'hydrolyser le cellobiose a été détectée; on ne peut cependant exclure que d'autres activités soient présentes, ayant pu échapper à la détection par exemple par suite d'une incapacité à hydrolyser le PNPG. Il ne faut également pas perdre de vue que le nombre de mutants analysés est très limité, et qu'en conséquence, toute interprétation statistique des résultats nécessite une certaine prudence.

Aucune des onze souches clb⁻ obtenues ne pousse sur agar M9 contenant 1 % de CMC comme source de carbone. Pour 6 de ces mutants, des révertants indépendants ont été isolés sur boîtes cellobiose et CMC. Dans chaque cas, les

révertants obtenus avaient recouvré la faculté d'utiliser les deux substrats. Ce résultat suggère que le métabolisme de la cellulose dépend strictement de celui du cellobiose; l'explication la plus simple étant que le cellobiose est un intermédiaire obligatoire entre la cellulose et le glucose. Cette interprétation est cependant sujette à caution. En effet l'analyse des mutants obtenus indique que la plupart d'entre eux pourraient être bloqués au niveau du transport du cellobiose dans la cellule (cf. ci-dessus). Dès lors si le cellobiose est le médiateur de l'induction des cellulases, on ne peut exclure que l'absence de croissance en cellulose ou en CMC soit due à l'incapacité des bactéries d'être induites pour la production de celles-ci. De fait, un des mutants clb⁻ a été testé en présence de cellulose et d'acétate et s'est révélé avoir une production de cellulase très inférieure à celle du type sauvage dans les mêmes conditions (table 7)

2.5.2. Mutants incapables de pousser sur cellulose (cls⁻)

L'isolement de ce type de mutants a été effectué sans sélection à l'ampicilline, afin d'obtenir également des mutants affectés dans les fonctions enzymatiques extracellulaires et pouvant de ce fait être complémentés en culture mixte par le type sauvage.

La première identification des souches a été effectuée par réplique sur papier buvard; toutefois, ce test donne souvent des résultats peu clairs et peu reproductibles, le type sauvage poussant très lentement. Afin de confirmer le phénotype cls⁻ des souches obtenues, celles-ci ont été retestées en mesurant la croissance en liquide. Le taux de croissance a été déterminé pour le glucose, le cellobiose et la

CMC, de manière d'une part à vérifier que l'absence de croissance en cellulose n'était pas due à un manque de vitalité de la souche et d'autre part à établir le phénotype complet vis-à-vis des dérivés de la cellulose. Trois mutants ont finalement été retenus, dont les propriétés sont décrites dans la table 6.

Les deux premiers; II_2 et II_8 , ont été isolés à partir d'une même culture et ne sont peut-être pas indépendants, d'autant plus que leurs propriétés sont assez voisines : la croissance est détectable, mais minime en cellobiose et en CMC et non détectable en cellulose. Ces mutants sont donc semblables aux mutants clb⁻ décrits ci-dessus, tout en présentant un léger niveau de fuite.

Le mutant IV_3 pousse normalement sur cellobiose (en fait même un peu plus rapidement que le type sauvage). En CMC, ce mutant finit par pousser avec un temps de génération comparable à celui du type sauvage, mais après un temps de latence très long (15-20 h. contre moins de 6 h. pour le type sauvage). Avec la cellulose, aucune croissance n'est détectable par mesure de la densité optique des bactéries. La croissance en CMC est sans doute due au fait que celle-ci est beaucoup plus facilement digérée que la cellulose et que de très faibles quantités de cellulases sont probablement suffisantes pour permettre la croissance.

La production de cellulase du mutant IV_3 a été mesurée pour des cultures en cellulose et en CMC. Les résultats de la table 7 montre que l'activité extracellulaire n'est pas détectable, ni en cellulose, ni en CMC. L'activité extracellulaire du type sauvage en CMC est assez imprécise en rai-

Table 6 : Temps de génération de divers mutants cls⁻ en présence de diverses sources de carbone.

Source de carbone	Glucose 0,2 %	Cellobiose 0,2 %	CMC 1 % centrifugée	Cellulose 2,5 %
Souche				
Type sauvage	190'	190'	240'	400- 450'
II ₂	170'	<1000'	<1000'	- ¹
II ₈	200'	<1000'	<1000'	- ¹
IV ₃	170'	140'	200-300'	- ¹

¹ Ne donne aucun signe de croissance après une semaine (type sauvage : croissance après 2 jours)

Une colonie fraîche de chaque souche est resuspendue dans 0,6 ml de milieu M9 sans source de carbone. 0,1 ml de la suspension obtenue sont inoculés dans 10 ml de M9 contenant le substrat indiqué. Lorsque la culture se trouble visiblement, la vitesse de croissance est déterminée en mesurant la densité optique à 600 nm.

Table 7 : Activité cellulolytique des mutants IV₃ (clb⁺, cls⁻) et 19 (clb⁻, cls⁻) en présence de cellulose et de CMC.

Source de carbone	2,5 % cellulose + 50 mM acétate de sodium			1 % CMC		
Souche	Activité extracellulaire U/O.D. 600 nm	Activité des cellules		Activité extracellulaire U/O.D. 600 nm	Activité des cellules	
		intactes U/O.D. 600 nm	soniquées U/O.D. 600 nm		intactes U/O.D. 600 nm	soniquées U/O.D. 600 nm
Type sauvage	215	11,3	33	60	19	29,5
IV ₃	<10	<2,7	11	<25	<7	<10
19	26	N.D. ¹	N.D. ¹	N.D. ¹	N.D. ¹	N.D. ¹

¹ Non déterminé

Pour mesurer l'activité extracellulaire en présence de cellulose, des cultures ayant poussé en L-Broth + 0,2 % glucose ont été lavées et resuspendues en milieu M9 + 2,5 % cellulose + 50 mM acétate de sodium (D.O. 600 nm = 2,5). Après deux jours d'incubation, l'activité extracellulaire soluble et liée à la cellulose a été déterminée comme décrit dans matériel et méthodes. Pour l'activité liée aux cellules, des cultures en croissance exponentielle (D.O. 600 nm < 1,5 pour les cultures en cellulose, D.O. 600 nm < 0,5 pour les cultures en CMC) ont été utilisées. Si nécessaire, la cellulose a d'abord été séparée des bactéries par centrifugation à basse vitesse, puis les bactéries ont été centrifugées et resuspendues en tampon BU. La densité optique a été mesurée à 600 nm avant et après sonication, et les données d'activité spécifique concernant les bactéries soniquées ont été corrigées en fonction du pourcentage des cellules ayant résisté aux ultra-sons (17-46 %).

son de la concentration élevée de sucres réducteurs présente dès le début de la réaction de dosage. Afin de vérifier si le blocage du mutant a lieu au niveau de la sécrétion des cellulases, l'activité cellulolytique a également été mesurée pour des cellules intactes et soniquées. La table 7 montre que dans les deux cas, l'activité est beaucoup plus faible pour le mutant que pour le type sauvage.

L'activité cellulolytique étant due à la présence de plusieurs enzymes (voir ci-dessous), il est donc vraisemblable que le phénotype de la souche IV₃ soit dû à une mutation pléiotropique.

2.5.3. Complémentation extracellulaire en culture mixte avec le type sauvage

Comme une grande partie de l'activité cellulolytique est normalement extracellulaire, on peut s'attendre à ce que le mutant IV₃ soit complémenté en culture mixte par le type sauvage, qui devrait pouvoir lui fournir les enzymes nécessaires. Cette expérience est aisément réalisable en conférant au mutant une résistance supplémentaire à la rifampicine, ce qui permet de mesurer son titre séparément à celui du type sauvage par étalement sur des boîtes contenant cet antibiotique. Le résultat est montré dans la figure 11 C. Pour une raison inconnue, la densité de cellules du mutant en culture pure commence par s'accroître d'environ 100 fois, mais se stabilise à un titre de $1-2 \cdot 10^7$ /ml, ce qui explique que la croissance ne soit pas détectée par mesure de la densité optique des bactéries. En culture mixte avec le type sauvage, cependant, le titre maximum atteint $2 \cdot 10^8$ /ml, ce qui représente une stimulation de 10 à 20 fois par rapport à

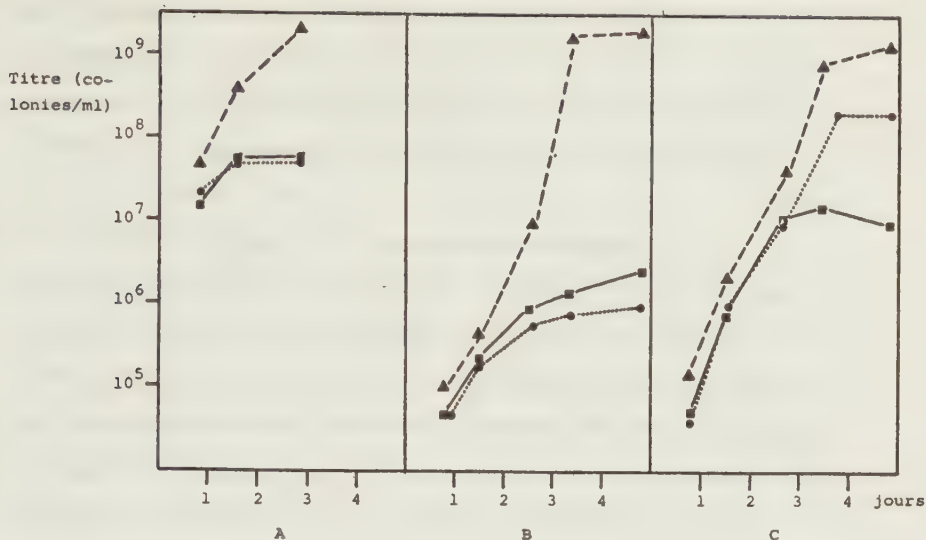


Figure 11 : Expériences de complémentation extracellulaire des mutants 19, II₂ et IV₃ par le type sauvage.

Deux cultures parallèles de souches résistantes à la rifampicine dérivées des mutants 19, II₂ et IV₃ ont été inoculées en M9-cellulose (2,5 %), l'une en présence et l'autre en absence de cellules de type sauvage. La croissance du mutant (à l'exclusion du type sauvage) a été suivie par étalement et comptage des colonies sur boîtes tryptone contenant 50 mg/l de rifampicine. La croissance globale (mutant + type sauvage) dans la culture mixte a été suivie par étalement et comptage des colonies sur boîtes tryptone sans rifampicine.

■—■, croissance du mutant en culture pure; ●.....●, croissance du mutant en présence du type sauvage; ▲—▲, croissance globale de la culture mixte. A, mutant 19 (*clb*⁻, *cls*⁻); B, mutant II₂ (*clb*⁻, *cls*⁻); C, mutant IV₃ (*clb*⁺, *cls*⁻).

la culture pure. Des contrôles effectués avec des colonies isolées sur boîtes contenant de la rifampicine montrent que l'effet observé n'est pas dû à la présence de révertants ou de recombinants (6/6 colonies testées étaient toujours cls⁻).

La même expérience a été répétée avec les mutants clb⁻ 19 et II₂. Comme il apparaît dans la figure 11 A et B, la présence de cellules de type sauvage n'induit aucune stimulation de la croissance, ce qui indique que la mutation présente dans ces souches n'affecte vraisemblablement pas une fonction extracellulaire. De plus, cette absence de complémentarisation permet également d'exclure que l'incapacité de ces mutants à utiliser la cellulose puisse être expliquée uniquement par un défaut d'induction des cellulases, en supposant que le cellobiose agisse comme inducteur et qu'un blocage du transport de celui-ci bloque l'induction. Il semble donc que l'absence de croissance des mutants clb⁻ en présence de cellulose comme seule source de carbone soit due au fait que le cellobiose, ou tout au moins un sucre dont le métabolisme est affecté par les mutations clb⁻, est probablement le produit de dégradation intermédiaire qui est assimilé par les bactéries.

3. Cellulases

3.1. Généralités

Le terme de cellulases regroupe toutes les enzymes capables d'attaquer la cellulose macromoléculaire par clivage hydrolytique. Ces enzymes, comme il a été décrit plus haut, peuvent être subdivisées en différents groupes suivant leur mode d'action endo ou exo et leur spécificité vis-à-vis de divers substrats (cellulose amorphe, cristalline, CMC soluble). Pour des raisons pratiques (rapidité et facilité du dosage), je me suis limité pour l'étude des cellulases à l'activité mesurable vis-à-vis de la CMC, tout en restant conscient qu'une telle approche ne donne qu'une vue incomplète du problème.

3.2. Localisation; présence d'enzymes liées à la cellulose

Il est possible de distinguer fondamentalement deux localisations pour les cellulases, celles-ci pouvant être soit liées aux cellules, soit extracellulaires. L'activité liée aux cellules n'a pas été étudiée systématiquement; le niveau observé, d'environ 10 unités/D.O._{600 nm} de bactéries (croissance en cellulose) est largement inférieur à celui des cellulases extracellulaires, qui atteint 100 à 200 unités /D.O._{600 nm} de bactéries. Les cellulases extracellulaires peuvent être subdivisées en deux groupes en fonction de leur liaison à la cellulose. Une partie d'entre elles peut en effet être mise en évidence dans le surnageant acellulaire de la culture, tandis que l'autre partie est fortement liée à la cellulose ajoutée comme substrat. Pour démontrer cette affinité, le culot cellulosique d'une culture centrifugée à basse vitesse (2000 trs./min. pendant 12 s) a été lavé 4 fois

par décantation en tampon BU. Après le troisième et le quatrième lavage, des aliquotes du culot ont été dosés pour les cellulases liées. 93 % de l'activité présente après le troisième lavage étaient encore présents après le quatrième lavage, ce qui démontre que l'activité est fortement liée à la cellulose et ne peut en être éluee par le tampon BU.

La contribution des bactéries contaminantes piégées dans la cellulose malgré les lavages peut être évaluée en connaissant l'activité liée aux bactéries, leur contenu en protéines et la quantité de protéines qu'il est possible d'extraire de la cellulose (à 100° C en présence de SDS). Un tel calcul montre que la contribution des bactéries ne dépasse pas 400 unités/g de cellulose sèche, soit 10 unités/ml pour une culture contenant 2,5 % de cellulose.

Cette activité se détache au cours du dosage en présence de CMC : si on centrifuge la cellulose pendant l'incubation et qu'on prélève le surnageant, l'hydrolyse de la CMC continue dans celui-ci à une vitesse atteignant 70 % de celle observée pour le mélange total, comprenant la cellulose. Cette élution est probablement due à une compétition spécifique de la CMC soluble avec la cellulose; l'affinité des enzymes est par ailleurs très forte : des lavages avec des tampons à haute force ionique (chlorure de sodium 3,6 M) ou avec des pH variant entre 3 et 11 sont impuissants à détacher l'activité, qui peut cependant être solubilisée par des solutions concentrées de chlorhydrate de guanidine (voir ci-dessous).

La liaison des enzymes à leur substrat présente l'avantage d'éviter qu'elles ne soient lavées par le ruissellement pouvant se produire dans le sol, où se trouve habituel-

lement Cellulomonas flavigena. D'autres exemples de cellulases ayant une forte affinité pour la cellulose ont été décrits pour les enzymes produites par Cytophaga (Marshall, 1973) et Trichoderma viride (Berghem et al., 1976).

3.3. Cinétique d'apparition des cellulases en fonction de la croissance de la culture

La figure 12 montre la cinétique de croissance et d'apparition de l'activité cellulolytique dans une culture poussant sur cellulose. On peut voir que l'activité liée à la cellulose apparaît en premier, atteint un maximum à la fin de la phase exponentielle et décroît de façon marquée durant la phase stationnaire. L'activité libre, qui apparaît principalement à la fin de la phase exponentielle et durant la phase stationnaire, ne commence à décroître que beaucoup plus tard. Cette variation du rapport entre les deux activités pourrait avoir plusieurs causes. Les enzymes déjà présentes pourraient être modifiées et perdre leur affinité pour la cellulose tout en gardant leur activité vis-à-vis de la CMC; de nouveaux types d'enzymes pourraient également être produits. Une autre possibilité serait que la cellulose soit modifiée de manière à réduire la constante de liaison.

Il faut noter que le retard dans l'apparition de l'activité pourrait être expliqué en supposant que toutes les enzymes se lient à la cellulose, de sorte que l'activité libre n'apparaîtrait dans la culture qu'une fois les sites de liaison saturés. Un tel schéma ne peut cependant expliquer la décroissance de l'activité liée à la cellulose durant la phase stationnaire.

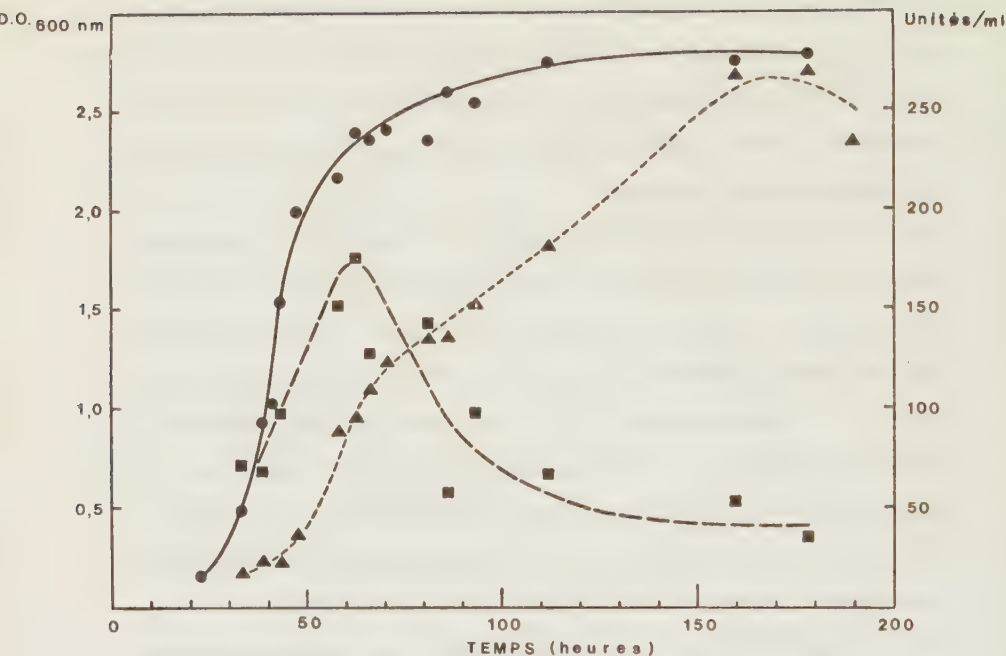


Figure 12 : Evolution de la croissance et de l'activité cellulolytique libre et liée à la cellulose dans une culture poussant en cellulose.

Une culture de 800 ml de IIBC (*Cellulomonas flavigena*) en M9 + 2,5 % cellulose a été incubée à 37° avec agitation. Aux temps indiqués des aliquotes ont été prélevés et analysés comme décrit dans matériel et méthodes.

●—● D.O. à 600 nm (croissance des cellules); ■----■ activité liée à la cellulose; ▲—▲ , activité libre.

3.4. Multiplicité des enzymes cellulolytiques

Tous les organismes cellulolytiques étudiés jusqu'à présent produisent une multiplicité d'enzymes différentes responsables de la dégradation de la cellulose (Eriksson, & Pettersson, 1975 a et b, Berghem & Pettersson, 1973, Berghem et al., 1975 et 1976, Wood, 1968, Halliwell & Griffin, 1973; Storvick & King, 1960, Pettersson & Porath, 1963, Gilligan & Reese, 1954, Enger & Sleeper, 1965, Yamane, Suzuki & Nisizawa, 1970 b, Osmundvag & Goksøyr, 1975). Chaque enzyme ayant un caractère défini, agissant de manière synergique avec les autres composants du système cellulolytique, l'étude de celui-ci nécessite l'identification, puis la purification et la caractérisation des différentes cellulases dont il est constitué. Pour IIbc, cette tâche a été entreprise pour les enzymes extracellulaires libres et liées à la cellulose.

Afin d'obtenir un premier aperçu de la multiplicité des enzymes contenues dans le surnageant des cultures, celui-ci a été analysé par électrophorèse sur gels non dénaturants de polyacrylamide. Le résultat d'une telle analyse est montré dans la figure 13 A. Quatre pics sont détectés, dont le premier au moins est probablement hétérogène.

3.5. Purification et caractérisation préliminaire de trois endocellulases

3.5.1. Source

Le matériel de départ est constitué de 10 litres de culture en milieu M9 contenant 2,5 % de cellulose en poudre (Whatman CF 11). Les bactéries ont été cultivées en fermenteur à 37° C avec une aération vigoureuse; leur croissance ainsi que l'activité des cultures ont été suivies comme décrit

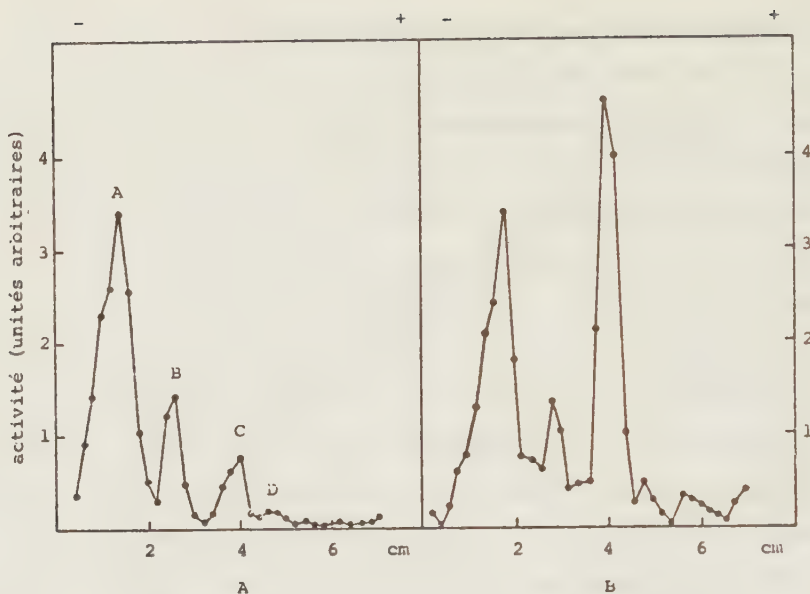


Figure 13 :

A. Profil d'activité cellulolytique d'un extrait brut après électrophorèse sur gel non dénaturant. 200 unités CMCase d'un surnageant brut concentré 15 fois par ultrafiltration ont été soumises à une électrophorèse sur un gel non dénaturant contenant 7,5 % de polyacrylamide et analysées comme décrit dans matériel. et méthodes. L'activité est donnée en unités arbitraires, la glycine présente dans le tampon d'électrophorèse interférant avec la détermination quantitative des sucres réducteurs.

B. Identité de la cellulase I avec le pic C de la figure 15 A : Un mélange composé de 200 unités de l'extrait de la figure 15 A et de 100 unités de cellulase I purifiée ont été soumis à une électrophorèse sur un gel non dénaturant en parallèle avec le gel de la figure 15 A.

ci-dessus (Matériel et méthodes). Les cultures ont été récoltées au début de la phase stationnaire.

3.5.2. Purification d'une endocellulase présente dans le surnageant (cellulase I)

3.5.2.1. Centrifugation

Après décantation de la cellulose par gravité, les bactéries ont été centrifugées à 9000 trs./min. pendant 20 min. dans un rotor Sorvall GSA.

3.5.2.2. Chromatographie d'adsorption sur Sephadex G-25

La purification des enzymes présentes dans le surnageant est rendue difficile par leur dilution dans un très grand volume, ce qui exclut leur concentration au moyen de techniques simples comme la précipitation au sulfate d'ammonium. L'enzyme I peut cependant être facilement concentrée et purifiée grâce à son affinité pour le Sephadex à haute force ionique.

480 ml de Sephadex G-25 gonflé ont été ajoutés au surnageant limpide d'une culture en cellulose de 10 l, dont la concentration en sulfate d'ammonium avait préalablement été ajustée à 0,2 M. Le mélange a été agité pendant une nuit à 4° C. Le surnageant a été décanté et la suspension de résine transvasée dans une colonne de 5 cm de diamètre. Le Sephadex a été lavé avec 3 volumes de tampon au phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,5 contenant du sulfate d'ammonium 0,2 M. L'effluent n'a pas été conservé. La colonne a été éluée avec un gradient de sel décroissant, le tampon de départ étant constitué de phosphate de potassium 0,04 M à pH 7,5 contenant du sulfate d'ammonium 0,08 M et le tampon final de Tris-HCl 5 mM à pH 7,5. Des fractions de 16 ml ont été collectées. La figure

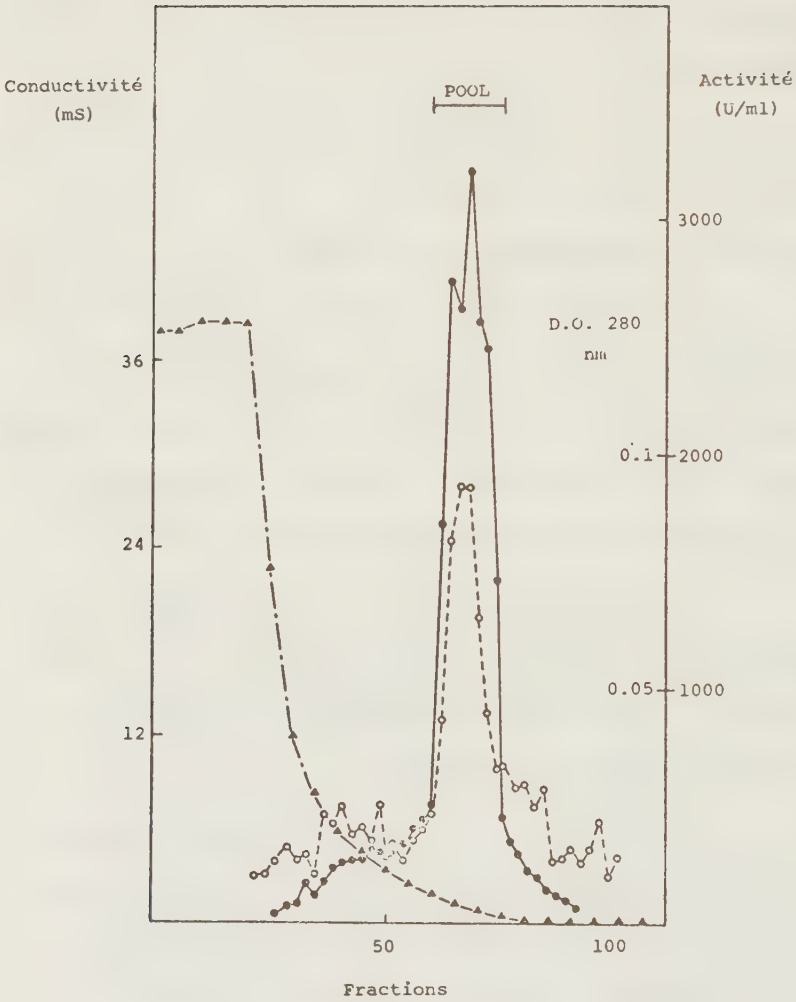


Figure 14 : Chromatographie de la cellulase I sur une colonne de Sephadex G-25.

▲—▲, conductivité; ○—○, densité optique à 280 nm;
●—●, activité.

14 montre l'élution de l'enzyme I à basse force ionique. Le Sephadex peut être régénéré par lavage dans l'acide chlorhydrique 0,05 N, rinçage à l'eau distillée, lavage dans la soude caustique 0,05 N suivi d'un rinçage final à l'eau distillée.

3.5.2.3. Colonne de Biogel P-150

Les fractions actives de la colonne de G-25 ont été rassemblées et concentrées par ultrafiltration. L'analyse sur gel de polyacrylamide-SDS ayant montré que la préparation obtenue contenait encore quelques impuretés (10-20 %), l'enzyme a été purifiée par filtration sur une colonne de Biogel P-150 (2,5 x 50 cm) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,0625 M à pH 6,8. Le pool des fractions actives a été concentré par ultrafiltration et conservé à -30° C après adjonction de 1,2 volumes de glycérol à 87 %. Un gel de la préparation obtenue est montré dans la figure 15 A.

3.5.3. Purification de l'endocellulase CA liée à la cellulose

3.5.3.1. Elution de la cellulose

Etant donné la forte affinité des cellulases liées à la cellulose pour leur substrat, leur solubilisation nécessite des agents suffisamment puissants pour les éluer, sans toutefois occasionner leur inactivation. Le moyen le plus pratique consiste à utiliser une solution concentrée de chlorhydrate de guanidine.

La cellulose décantée d'une culture de 10 litres a été lavée 5 fois par décantation dans 5 litres de Tris-HCl 5 mM à pH 7,5. La suspension a été transvasée dans une colonne de 8 cm de diamètre et lavée avec 1 litre de Tris-HCl 10 mM à pH 7,5 contenant du chlorure de sodium 2 M. L'effluent

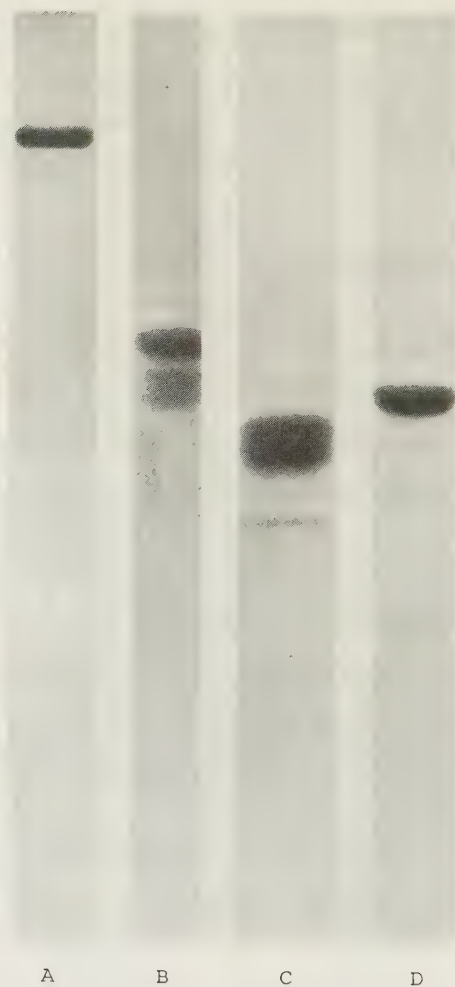


Figure 15 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS des cellulases I, CA et CB.

A, enzyme I purifiée ($10\text{ }\mu\text{g}$), gel à 12,5 % d'acrylamide;
B, enzymes C après la colonne de DEAE-Sephadex ($10\text{ }\mu\text{g}$), gel à 12,5 % d'acrylamide; C, enzyme CA purifiée ($10\text{ }\mu\text{g}$), gel à 10 % d'acrylamide; D, enzyme CB purifiée ($7\text{ }\mu\text{g}$), gel à 10 % d'acrylamide. Pour des raisons de clarté, les bandes du gel B ont été alignées sur celles des gels C et D afin de faire ressortir leur homologie.

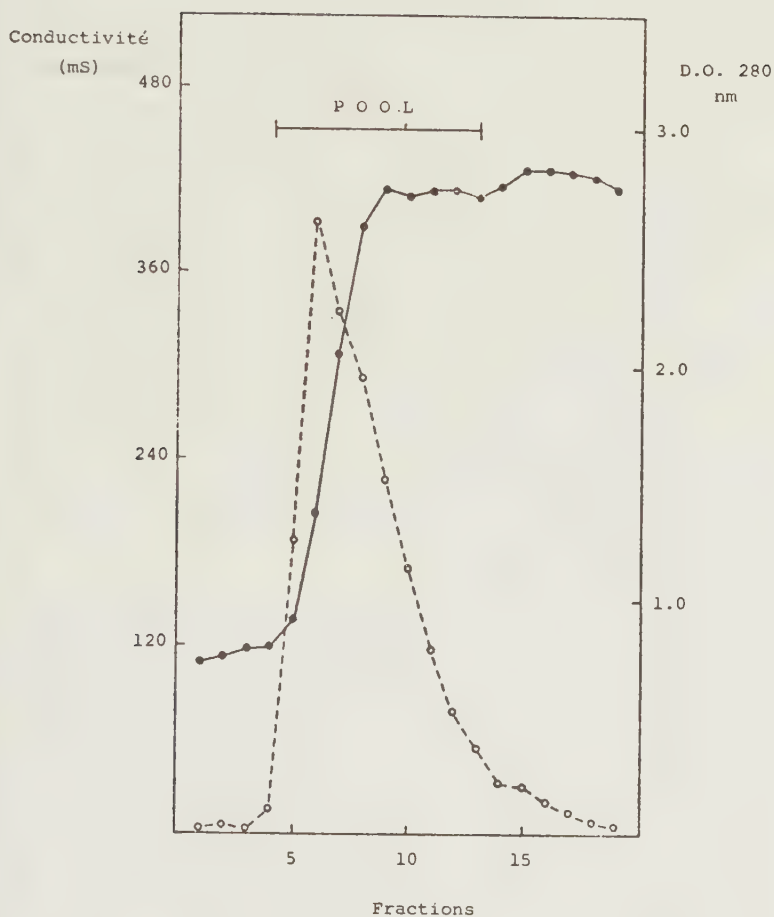


Figure 16 : Elution par le chlorhydrate de guanidine des protéines adsorbées à la cellulose ajoutée comme source de carbone dans les cultures
 ●—●, conductivité; ●-----●, densité optique à 280 nm.

n'a pas été conservé. La colonne a été éluée avec 500 ml de chlorhydrate de guanidine 8 M dissous dans du Tris-HCl 10 mM à pH 7,5, en collectant des fractions de 15 ml. Une certaine quantité de bactéries a été éluée avec le matériel adsorbé et éliminée par centrifugation des fractions troubles. L'élution des protéines à partir d'une telle colonne est montrée dans la figure 16. Le dosage de l'activité cellulolytique n'est pas possible en présence de guanidine. Les fractions présentant une forte absorbance à 280 nm ont été rassemblées et dialysées de manière extensive contre un tampon de borate de sodium à pH 10,5. Cette étape et toutes les suivantes ont été effectuées à 4° C. L'alcalinité du tampon de dialyse a pour but une inactivation réversible des cellulases, qui sinon attaqueraient le sac à dialyse. Le pH a ensuite été ajusté à 8 au moyen d'acide chlorhydrique dilué et le précipité formé au cours de la dialyse éliminé par centrifugation.

2.5.3.2. Colonne de DEAE-Sephadex

L'extrait au chlorhydrate de guanidine dialysé et neutralisé, contenant 160 unités de D.O. 280 nm de protéines, a été chargé sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 (dimension originales 2,5 x 25 cm) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8 contenant du chlorure de sodium 8 mM. La colonne a été lavée avec 300-400 ml du même tampon, en collectant des fractions de 15 ml, puis l'élution a été effectuée au moyen d'un gradient exponentiel de 1000 ml s'élevant jusqu'à une concentration finale en phosphate de potassium de 0,3 M à pH 8 (fractions de 10 ml). Le niveau du liquide au-dessus de la résine a été maintenu à un niveau minimum en laissant périodiquement entrer un peu d'air dans la colonne au fur et à mesu-

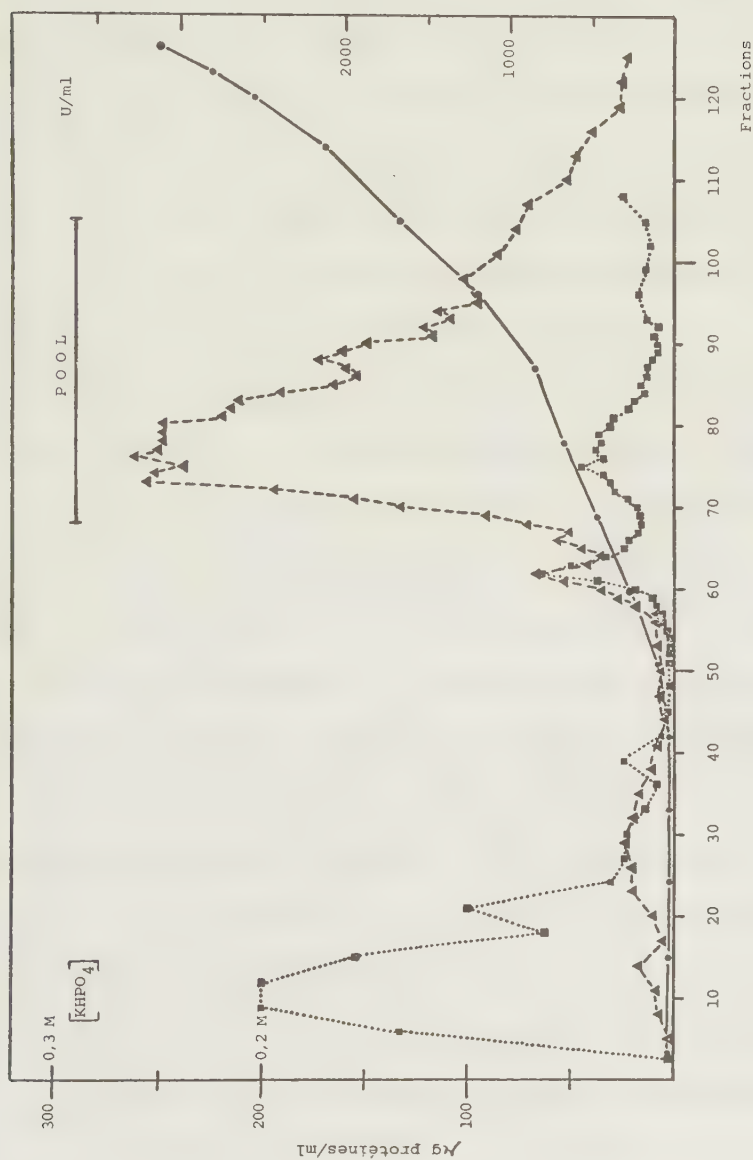


Figure 17 : Chromatographie sur DEAE-Sephadex des cellulases éluées à partir de la cellulose (enzymes CA et CB).

●, conductivité; ■, densité optique à 280 nm; ▲, activité.

re que la résine se contractait.

Le profil d'élution de la colonne de DEAE-Sephadex est montré dans la figure 17. L'analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide ne montrant aucune résolution significative des protéines contenues dans les fractions 67 à 105, celles-ci ont été rassemblées. Les bandes de protéines après électrophorèse de la préparation obtenue sur gel en présence de SDS sont montrées dans la figure 15 B.

3.5.3.3. Chromatographie sur Sephadex G-200

Afin de séparer les bandes présentes dans la figure 15 B, les fractions rassemblées de la colonne de DEAE-Sephadex ont été concentrées par ultrafiltration et chargées sur une colonne de Sephadex G-200 (25 x 80 cm) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM à pH 7,5.

Bien que cette étape soit apparue d'abord comme peu avantageuse, ne permettant pas de résolution de l'activité et des protéines et provoquant une perte de 50 % de l'activité, l'analyse sur gel (figure 15 C) montre que la bande supérieure de la figure 15 B disparaît. Ceci est dû à l'adsorption de la bande supérieure, définie comme enzyme CB (voir ci-dessous), à la matrice de Sephadex. Ayant démontré que la large bande restante, définie comme enzyme CA, est une glycoprotéine (voir ci-dessous, 3.5.8.), sa purification n'a pas été poursuivie plus loin, en supposant que son hétérogénéité était due à sa glycosylation. Les fractions actives ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration et conservées à -30°C après adjonction de 1,2 volumes de glycérol à 87 %.

3.5.4. Purification de l'enzyme CB liée à la cellulose

3.5.4.1. Elution de la cellulose

L'élution a été effectuée comme pour l'enzyme CA.

3.5.4.2. Chromatographie sur Sephadex G-25

Cette étape tire parti du fait que l'enzyme s'adsorbe au Sephadex.

L'extrait au chlorhydrate de guanidine dialysé et neutralisé, contenant 160-200 unités de D.O._{280 nm} de protéines, a été chargé sur une colonne de Sephadex G-25 (5 x 25 cm) équilibrée avec du Tris-HCl 20 mM à pH 7,5. La colonne a été lavée avec 350 ml du même tampon et éluée avec un gradient linéaire de 700 ml établi entre le tampon de lavage et un tampon de borate de sodium 20 mM à pH 11 (fractions de 16 ml). Toutes les fractions du gradient ont été collectées dans des tubes contenant 0,5 ml de dihydrogénophosphate de potassium 1 M afin de les neutraliser aussi rapidement que possible.

Le profil d'élution est montré dans la figure 18. La raison pour laquelle l'activité adsorbée est éluée en trois pics est inconnue, étant donné que ces trois pics peuvent être rassemblés et purifiés comme une seule enzyme (voir ci-dessous).

3.5.4.3. Filtration sur Biogel P-150

Les fractions obtenues après la colonne de DEAE-Sephadex ont été purifiées par filtration sur une colonne de Biogel P-150 équilibrée avec un tampon Tris-HCl 0,0625 M à pH 6,8, en collectant des fractions de 4 ml (figure 19). Les fractions actives ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration et conservées à -30° C après adjonction de 1,2 volumes de glycérol à 87 %. L'analyse sur gel de la préparation

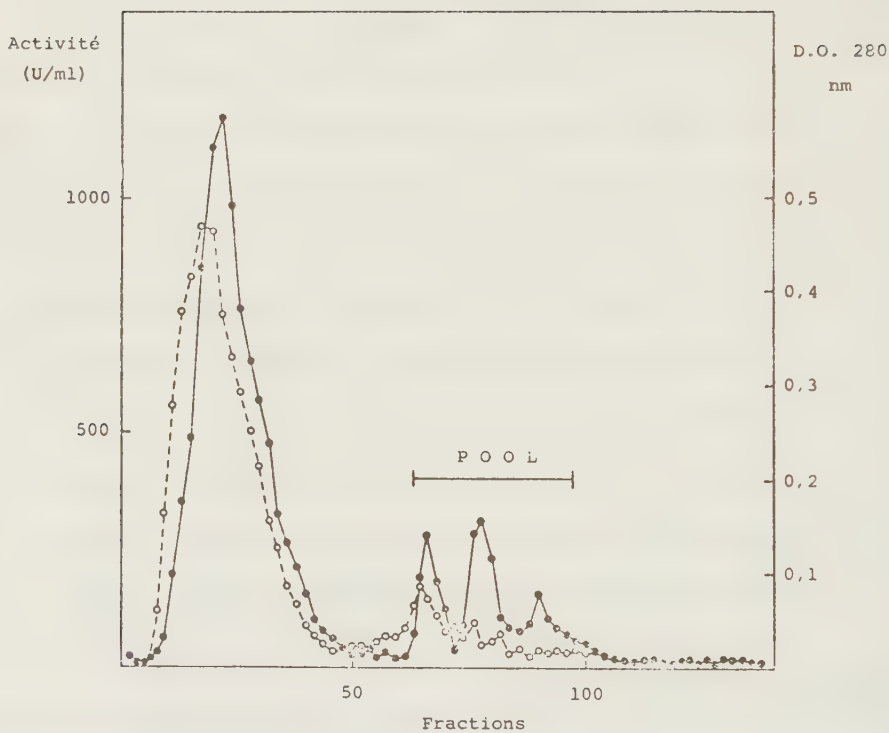


Figure 18 : Chromatographie de l'enzyme CB sur Sephadex G-25. La colonne a d'abord été lavée avec du Tris-HCl 20 mM à pH 7,5 puis éluée avec un gradient de pH comme décrit dans matériel et méthodes.

○-----○ , densité optique à 280 nm, ●————● , activité.

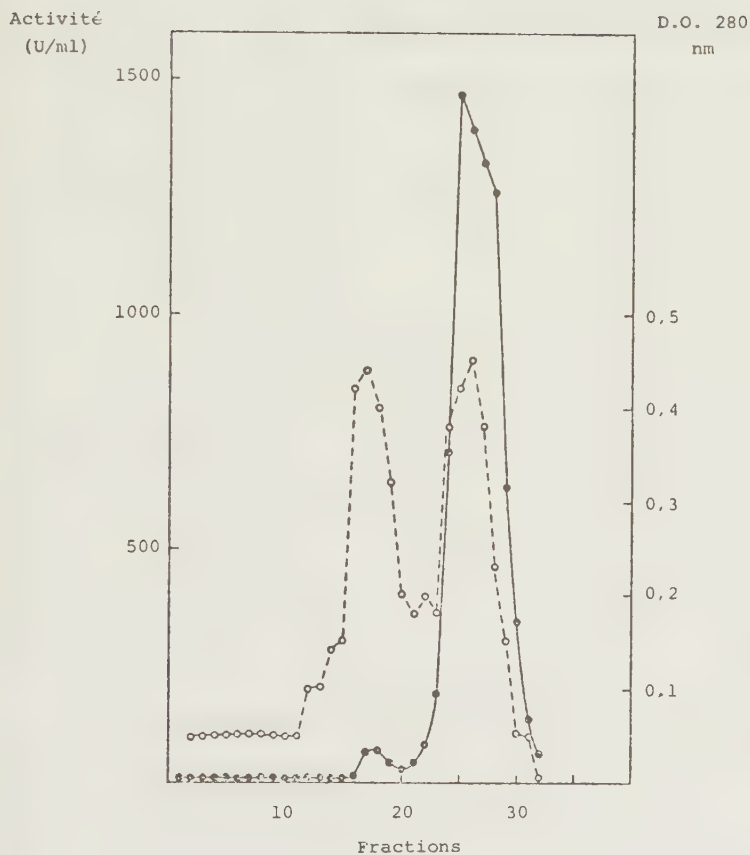


Figure 19 : Filtration de l'enzyme CB sur une colonne de Bio-gel P-150.

●-----● , densité optique à 280 nm; ●-----● , activité.

obtenue est montrée dans la figure 15 D.

3.5.5. Pureté des enzymes obtenues

Afin d'estimer la pureté des cellulases I, CA et CB, l'intensité relative des bandes principales et contaminantes a été mesurée par densitométrie à 560 nm dans des gels de polyacrylamide-SDS colorés au bleu de Coomassie. Les résultats sont donnés dans la table 8. La correspondance entre la bande principale observée dans les gels colorés et l'activité cellulolytique a été vérifiée par électrophorèse sur deux gels parallèles non dénaturants, en comparant le profil d'activité avec la position des bandes de protéines colorées. La figure 20 montre une bonne correspondance entre la migration du pic d'activité et celle de la bande principale.

3.5.6. Bilan

La détermination des activités présente une incertitude en raison de la non linéarité du dosage en fonction du temps ou de la concentration d'enzyme : la vitesse d'hydrolyse de la CMC ralentit déjà nettement après qu'une petite fraction seulement du substrat est hydrolysé. Cet effet a été étudié avec les enzymes purifiées et est discuté plus en détail ci-dessous. Etant donné qu'au cours de la purification, les dosages n'ont été effectués qu'une fois, avec une seule concentration d'enzyme et un seul temps d'incubation, leur valeur absolue est douteuse. En conséquence, l'analyse du rendement de chaque étape a dû être abandonnée. Pour chaque étape de fractionnement, les dosages effectués en parallèle conviennent cependant parfaitement pour décrire le profil général d'activité parmi les différentes fractions.

Le bilan final de l'activité et des protéines est

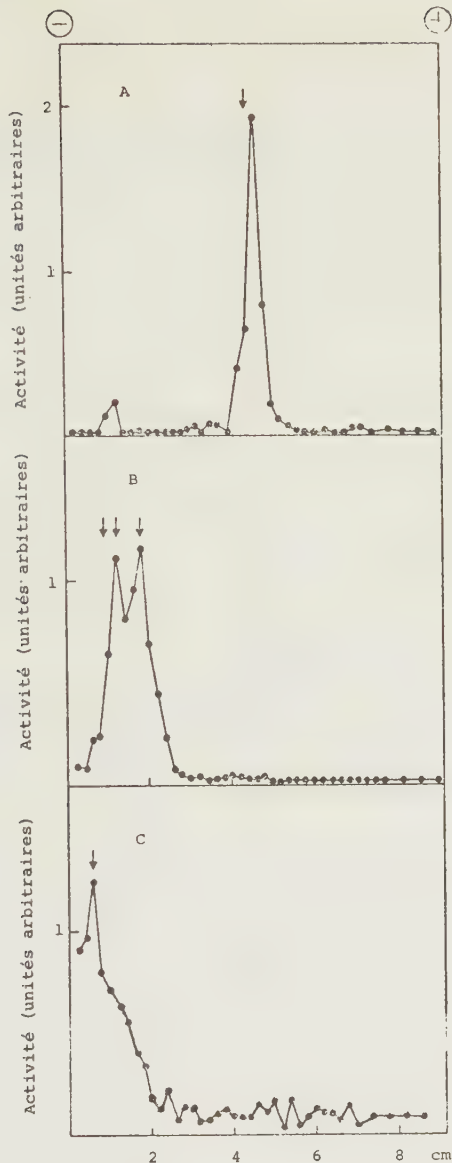


Figure 20 : Migration des cellulases I, Ca et CB sur gels de polyacrylamide non dénaturants.

Les enzymes ont été soumises à une électrophorèse sur gel à 7,5 % d'acrylamide sans SDS et analysés comme décrit dans matériel et méthodes. Les flèches montrent la position des bandes visibles sur un gel parallèle coloré au bleu de Coomassie. A, enzyme I (45 μ g); B, enzyme Ca (45 μ g), C, enzyme CB (78 μ g).

donné dans la table 8, où l'activité est donnée comme la vitesse initiale d'hydrolyse d'une solution de CMC à 1 %. Le mauvais rendement de l'activité peut être dû aux causes suivantes :

- Les enzymes purifiées ne représentent pas toutes les cellulases présentes dans le milieu (voir figure 13 A et ci-dessous).
- Certaines étapes de purification causent sans doute des pertes par inactivation. En particulier, l'éluition à la guanidine pourrait détruire certaines enzymes; le pH élevé de l'étape de dialyse, bien qu'utile afin d'éviter la digestion du sac à dialyse, résulte en une perte de 40 à 50 % d'activité par rapport à une dialyse à pH neutre. De même, l'élution à pH élevé de l'enzyme CB provoque une inactivation sévère, qui est responsable de la faible activité spécifique de la préparation obtenue.

3.5.7. Poids moléculaires

La table 8 indique les poids moléculaires des enzymes I, CA et CB, estimés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

3.5.8. Glycosylation

La présence d'hydrates de carbone sur les enzymes CA et CB a été détectée à la fois sur gel au moyen de la coloration à l'acide periodique et au réactif de Schiff et par rétention sur colonne de Con A-Sepharose. Ce type de résine est constitué d'une lectine, la concanavoline A, couplée au Sepharose de façon covalente et ayant la propriété de se fixer spécifiquement sur certains résidus d'hydrates de carbone, en particulier les groupes α -glucosidiques et α -mannosidiques (Poretz & Goldstein, 1970). Les deux cellulases peuvent être

Table 8 : Bilan de la purification des cellulases

Matériel	Protéines totales mg	Activité totale unités	Activité spécifique unités/ml	Pureté	Coloration avec l' acide périodique et le réactif de Schiff	Rétention sur colonne de ConA- Sepharose	Poids moléculaire kilodaltons
Surnageant de culture	n.d. ¹	$5,5 \cdot 10^6$	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	+, ²	-
Activité liée à la cellulose	n.d. ¹	$2,5 \cdot 10^6$	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	n.d. ¹	-
Enzyme I	6,2	10^6	162	95 %	-	-	118
Enzyme CA	1,1	$1,5 \cdot 10^5$	136	93 %	+	+	49-52
Enzyme CB	3,1	$3,0 \cdot 10^4$	9,7	85 %	+	+	53,5

¹ Non déterminé

² Activité retenue en partie

complètement retenues (>98 %) sur une colonne de Con A-Sephrose en présence de Tris-HCl 10 mM à pH 7,4. Environ 55 à 60 % de l'activité peuvent être récupérés en éluant la colonne avec de l' α -méthylmannoside 0,475 M en tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,4. L'élution est cependant assez inefficace et donne un pic large s'étendant sur plusieurs fois le volume de la colonne malgré la concentration élevée d' α -méthylmannoside.

3.5.9. Propriétés enzymatiques

3.5.9.1. Activité endocellulolytique

La figure 21 montre une cinétique simultanée de la production des sucres réducteurs et de la baisse de viscosité dans une solution de CMC incubée avec les cellulases I, CA et CB. La baisse rapide de viscosité observée au début de la réaction correspond à un mode de dégradation endo pour les trois enzymes.

3.5.9.2. Non linéarité de la cinétique d'hydrolyse

La figure 22 montre que la vitesse d'hydrolyse de la CMC diminue rapidement après qu'un à deux pourcent du substrat a été digéré (100 à 200 g d'équivalents glucose/ml pour la CMC à 1 %). Cet effet n'est pas dû à une inactivation de l'enzyme au cours de la réaction : des courbes semblables peuvent être obtenues soit en variant le temps d'incubation et en maintenant la concentration d'enzyme constante, soit, vice versa, en variant la concentration d'enzyme et en maintenant le temps d'incubation constant.

La baisse d'activité observée peut avoir deux explications :

- La CMC se comporte peut-être comme un substrat hétérogène,

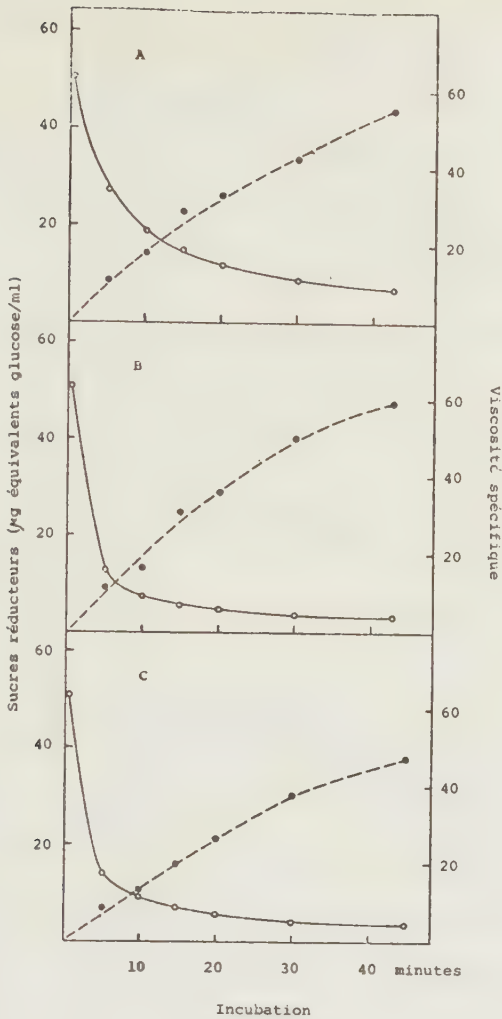


Figure 21 : Cinétique simultanée de la baisse de viscosité et de l'apparition des sucres réducteurs provoquées par les enzymes I, CA et CB.

Des aliquotes d'enzyme ont été inoculés dans 7 ml d'une solution de CMC centrifugée contenant 0,26 % de CMC (mesurée selon le dosage à l'orcinol-acide sulfurique décrit par Miller (1960). Aux temps indiqués, des aliquotes de 1 ml ont été prélevés et la réaction stoppée à 100° C. Après équilibration à température ambiante, la viscosité spécifique (Storvick & King, 1960) et le contenu en sucres réducteurs ont été déterminés pour chaque échantillon.

A, enzyme I; B, enzyme CA; C, enzyme CB.

—●—, viscosité spécifique; —○—, sucres réducteurs.

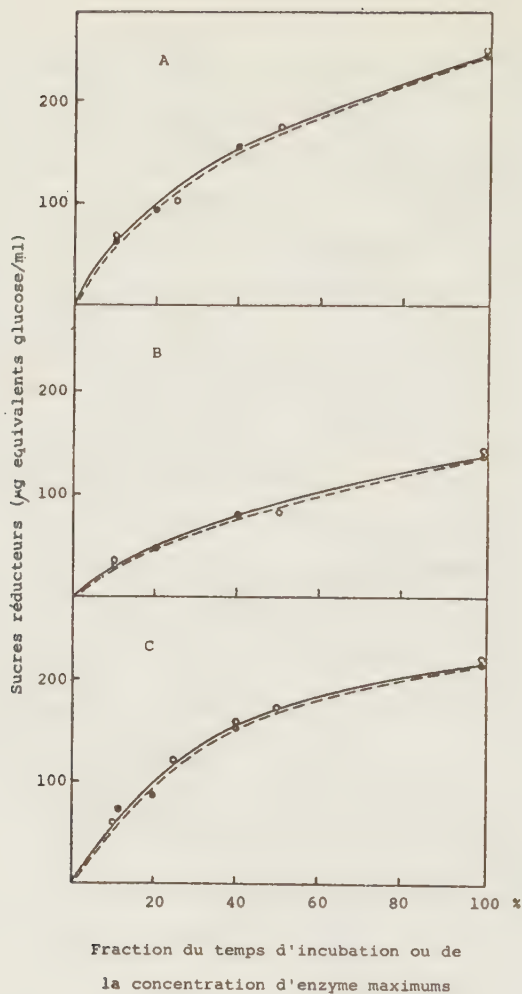


Figure 22 : Cinétique non linéaire de l'hydrolyse de la CMC par les enzymes I, CA et CB.

Des aliquotes d'enzyme ont été incubés soit à des concentrations variables (●---●) pendant 120 min., soit à des concentrations fixes (●—●) pendant un temps variable. Les résultats sont portés sur le graphique de manière que le produit de la concentration d'enzyme et du temps d'incubation corresponde à la même valeur d'abscisse pour les deux courbes.

A, enzyme I; B, enzyme CA ; C, enzyme CB.

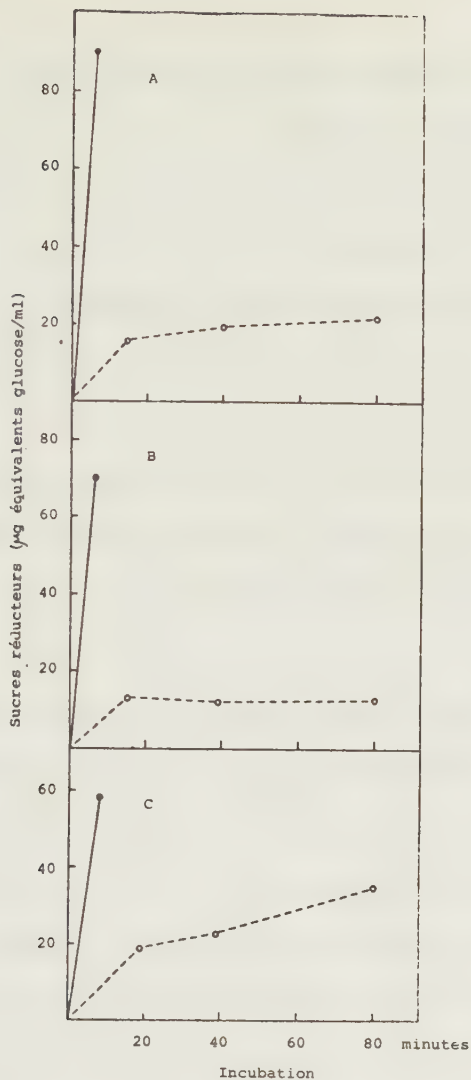


Figure 23 : Cinétique d'hydrolyse de la cellulose CF 11 comparée à l'hydrolyse de la CMC.

Des aliquotes des enzymes I, CA et CB ont été incubés avec 50 mg de cellulose CF 11 en suspension dans 1 ml de milieu M9, ou avec 0,5 ml de CMC 1 % en solution dans M9. Aux temps indiqués, la réaction a été stoppée à 100° C, les échantillons contenant de la cellulose ont été centrifugés et les sucres réducteurs dosés dans le surnageant.

●—●, hydrolyse de la CMC, ●-----●, hydrolyse de la cellulose. A, enzyme I (22 µg); B, enzyme CA (11 µg); C, enzyme CB (7,8 µg).

les régions les moins substituées étant hydrolysées plus rapidement que les autres.

- Un produit de la réaction pourrait inhiber la continuation de l'hydrolyse, par exemple en participant à une réaction de transglycosylation.

3.5.9.3. Activité vis-à-vis de la cellulose en poudre

La figure 23 compare l'activité des enzymes I, CA et CB vis-à-vis de la cellulose CF 11 et de la CMC. La vitesse d'hydrolyse est plus lente d'un ordre de grandeur pour la cellulose CF 11 que pour la CMC. En outre, avec les enzymes I et CA, la réaction semble s'arrêter complètement après qu'une très faible fraction de la cellulose a été dégradée.

3.5.10. Discussion

La purification des trois enzymes décrites ci-dessus a été facilitée par leur capacité de s'adsorber à une matrice insoluble, ce qui permet, par simple décantation, de les concentrer à partir d'un très grand volume et d'effectuer une purification préliminaire par la même occasion. La forte affinité des cellulases pour la cellulose n'est pas inattendue; elle a été décrite pour d'autres souches de bactéries et de champignons cellulolytiques (Gilligan & Reese, 1954, Marshall, 1973, Berghem et al., 1976). L'affinité des cellulases I et CB pour le Sephadex est plus difficile à expliquer. Ni I ni CB ne sont actives vis-à-vis du dextrane linéaire soluble, qui est le polymère utilisé pour préparer le Sephadex par pontage intercaténaire. Ce même dextrane n'agit pas non plus comme inhibiteur vis-à-vis de l'activité de CB. Le fait que I soit élue à basse force ionique pourrait être dû à la pré-

sence de groupes chargés sur le Sephadex exerçant vis-à-vis de l'enzyme une répulsion contrecarrant l'affinité de celle-ci. Comme toutes les interactions électrostatiques, celle-ci serait maximale à faible force ionique. Quel qu'en soit le mécanisme, on peut noter que Berghem et al. (1976) ont décrit une élution à basse force ionique similaire lors d'une chromatographie d'affinité sur cellulose d'une cellulase de Trichoderma viride.

D'autres cellulases glycosylées ont été isolées à partir de bactéries et de champignons (Yamane et al., 1970 b, Berghem & Pettersson, 1973, Berghem et al., 1976, Eriksson & Pettersson, 1975 a), sans qu'il soit possible d'assigner une fonction aux hydrates de carbone liés à ces enzymes. L'affinité des cellulases de Sporotrichum pulverulentum pour la concanavaline A liée au Sepharose a été utilisée pour leur purification (Eriksson & Pettersson, 1975 a). Pour les enzymes CA et CB, des expériences préliminaires ont toutefois montré qu'une telle étape n'était pas très avantageuse, l'affinité étant si forte qu'elle provoque une grande traîne d'élution et un mauvais rendement même si de fortes concentrations d' α -méthylmannoside sont utilisés pour l'élution de la Con A-Sepharose.

Les cellulases I, CA et CB ne représentent certainement pas la totalité du système enzymatique utilisé par Cellulomonas flavigena pour digérer la cellulose. Leur faible activité vis-à-vis de la cellulose native permet de supposer que d'autres composants sont nécessaires pour la dégradation de celle-ci. De plus, des fractionnements préliminaires (voir ci-dessous) et l'analyse sur gels non dénaturants (figure 13 A)

montrent qu'au moins deux autres cellulases sont présentes dans le surnageant des cultures. En ce qui concerne les enzymes liées à la cellulose, le pic majeur d'activité semble correspondre aux enzymes CA et CB. Ceci n'exclut pas cependant que d'autres cellulases présentes à l'origine échappent à la détection, par exemple durant l'élution à la guanidine ou la dialyse à pH élevé.

En outre le dosage des cellulases utilisé pour ce travail, basé sur l'hydrolyse de la CMC, est aisé et rapide, mais non adapté à la détection de toutes les activités qui pourraient contribuer au processus de dégradation. En particulier, les enzymes suivantes, qui ont été décrites pour d'autres organismes cellulolytiques, ne manifestent pas d'activité dans le dosage à la CMC :

- a) les exocellulases : plusieurs cellulases attaquant les chaînes cellulosiques à partir de l'extrémité n'ont que très peu ou pas d'activité vis-à-vis de la CMC, sans doute parce qu'elles s'arrêtent lorsqu'elles rencontrent un résidu carboxyméthylé.
- b) Les phosphorylases : le clivage phosphorolytique de la CMC ne se manifesterait que par une baisse de viscosité; le dosage selon Nelson-Somogyi ne révélerait pas de sucres réducteurs, étant donné que les nouvelles extrémités réductrices engendrées seraient masquées par la présence d'un groupe phosphate. Les phosphorylases décrites dans la littérature concernent surtout le cellobiose (Alexander, 1968, Sato & Takahashi, 1967, Hütterman & Volger, 1973); une cellulase dextrine phosphorylase active vis-à-vis de dextrines ayant un poids moléculaire supérieur à celui du cellobiose a ce-

pendant été isolée chez Clostridium thermocellum (Seth & Alexander, 1969).

- c) les enzymes procédant par attaque oxydative : chez certains champignons, dont T. viride, l'attaque de la cellulose s'accompagne d'une consommation d'oxygène et de l'apparition de résidus gluconiques et glucuroniques (Eriksson et al., 1974). Cette oxydation facilite apparemment la digestion des fibres de coton en créant des groupes acides qui en disloquent la structure.

3.6. Fractionnements préliminaires des autres activités présentes dans le surnageant

Plusieurs tentatives ont été effectuées en vue d'identifier les diverses cellulases présentes dans le surnageant des cultures, en particulier par rapport aux espèces apparaissant sur les gels non dénaturants (figure 13 A).

3.6.1. Identité de l'enzyme I et du pic C

Les figures 13 A et B montrent que l'enzyme I purifiée et le pic C de l'extrait brut migrent de manière non distinguable sur les gels non dénaturants.

3.6.2. Séparation de l'activité correspondant au pic D

La figure 13 A montre un faible pic d'activité (pic D) migrant plus rapidement que l'enzyme I (= pic C). L'existence de ce pic, souvent peu apparent sur les gels effectués avec des extraits bruts, a été confirmée en purifiant à partir d'un surnageant concentré au sulfate d'ammonium l'activité qui lui correspond.

3.6.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium en présence de BSA

550 g/l de sulfate d'ammonium et 200 mg/l de BSA ont été ajoutés au surnageant d'une culture de 10 litres

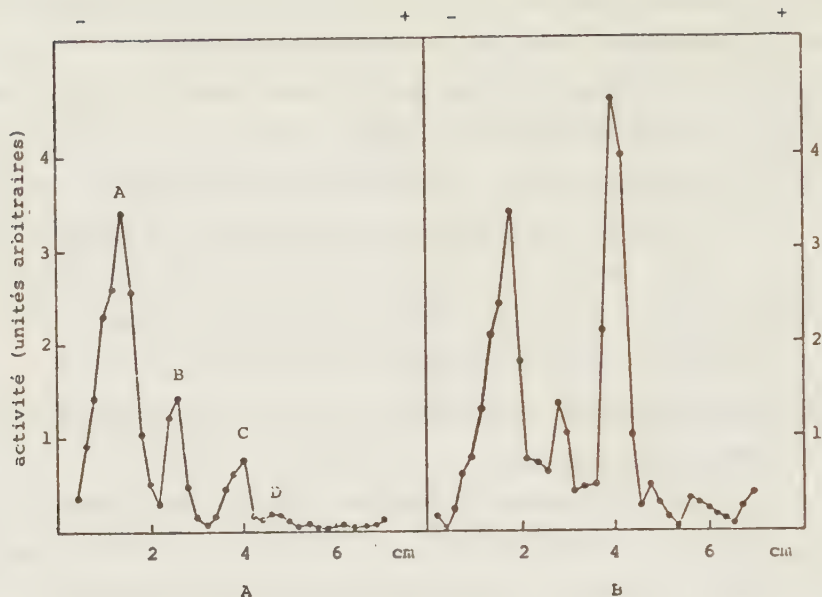


Figure 13 :

A. Profil d'activité cellulolytique d'un extrait brut après électrophorèse sur gel non dénaturant. 200 unités CMCase d'un surnageant brut concentré 15 fois par ultrafiltration ont été soumises à une électrophorèse sur un gel non dénaturant contenant 7.5 % de polyacrylamide et analysées comme décrit dans matériel et méthodes. L'activité est donnée en unités arbitraires, la glycine présente dans le tampon d'électrophorèse interférant avec la détermination quantitative des sucres réducteurs.

B. Identité de la cellulase I avec le pic C de la figure 15 A : Un mélange composé de 200 unités de l'extrait de la figure 15 A et de 100 unités de cellulase I purifiée ont été soumis à une électrophorèse sur un gel non dénaturant en parallèle avec le gel de la figure 15 A.

en cellulose contenant 50-100 mg/l de protéines totales. Après 12 h. à 4° C, le précipité a été centrifugé à 9000 trs./min. pendant 30 min. dans un rotor Sorvall GSA et resuspendu dans du tampon BU (100 ml).

Cette technique de concentration donne des rendements peu reproductibles et souvent mauvais (parfois moins de 10 %) et la contamination par la BSA complique la purification à homogénéité. Il a cependant été possible, en fractionnant ces extraits, de tirer certains renseignements préliminaires sur les cellulases présentes dans le surnageant.

3.6.2.2. Chromatographie sur Sephadex G-25

Le concentré au sulfate d'ammonium a été chargé sur une colonne de Sephadex G-25 (38 x 2,7 cm) équilibrée avec un tampon de phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,5 contenant du sulfate d'ammonium 0,5 M, du sulfate de magnésium 1 mM et du nitrate de sodium 10 mM. La colonne a été éluée avec le même tampon, mais contenant seulement 0,2 M de sulfate d'ammonium. La figure 24 montre que les cellulases chromatographient en deux pics sur Sephadex G-25 à haut sel.

3.6.2.3. Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50

Le premier des pics obtenus (pic SA) a été chromatographié sur une colonne de DEAE-Sephadex (figure 25).

Après dessalage sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée avec un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,4, contenant du sulfate de magnésium 1 mM et du nitrate de sodium 0,5 mM, la fraction du surnageant non retardée sur Sephadex (fraction SA) a été chargée sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 équilibrée avec le même tampon. Après lavage, la colonne a été éluée avec un gradient de phosphate de potassium à pH 7,5 s'

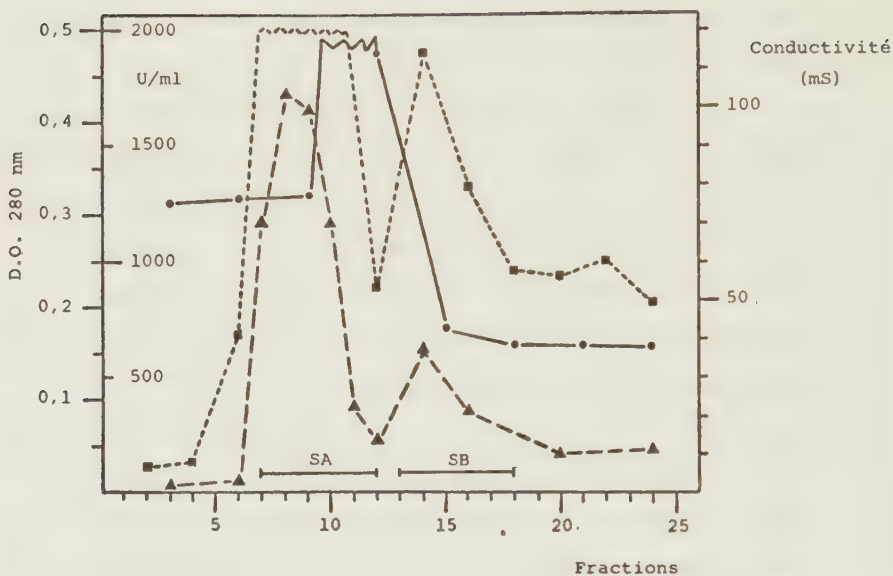


Figure 24 : Chromatographie sur Sephadex G-25 d'un extrait brut concentré au sulfate d'ammonium.

●—●, conductivité; ■—■, densité optique à 280 nm;
 ▲—▲, activité.

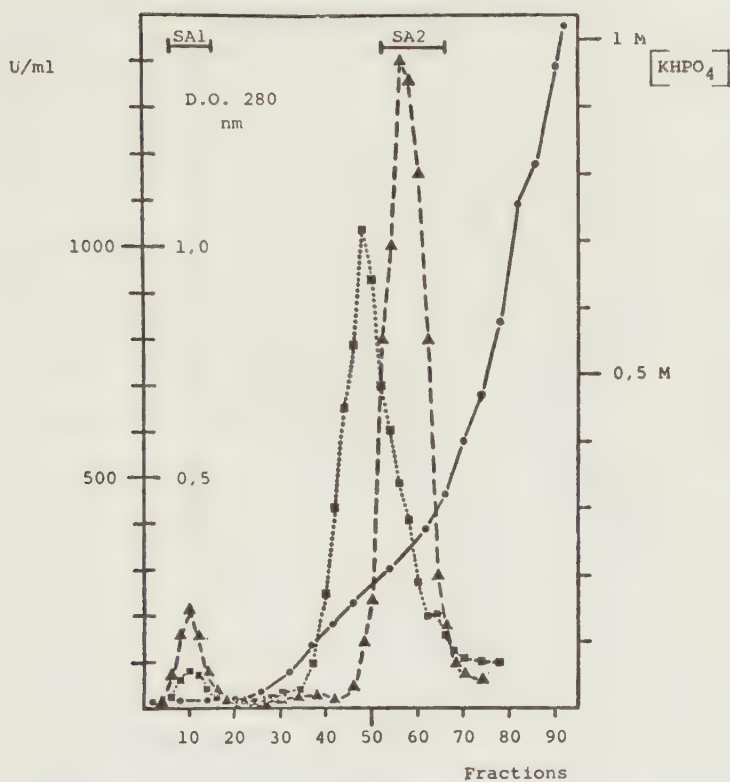


Figure 25 : Sous-fractionnement du pic SA sur DEAE-Sephadex A-50.

●—●, concentration en phosphate; ■·····■, densité optique à 280 nm; ▲—▲, activité.

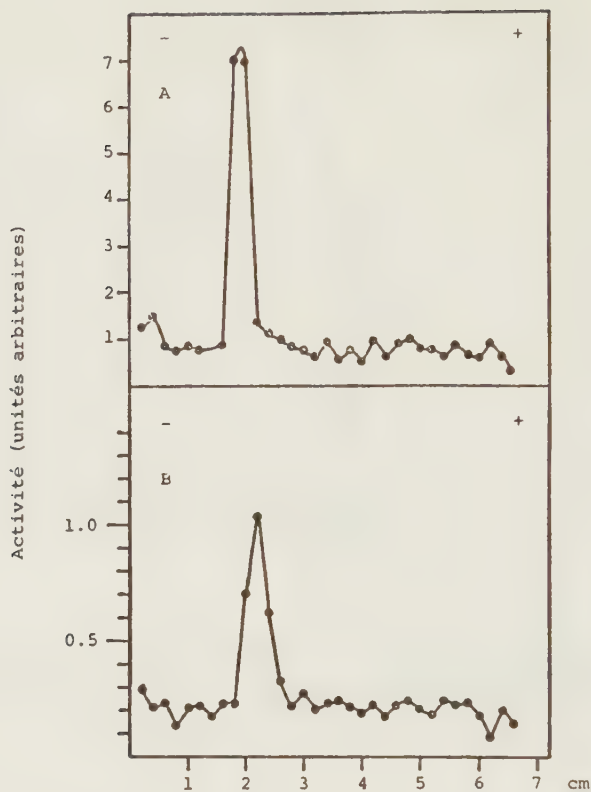


Figure 26 : Electrophorèse du pic SA2 et de la cellulase I purifiée sur gels non dénaturants à 10 % d'acrylamide. A, enzyme I, 350 unités; B, pic SA2, 85 unités.

élevant jusqu'à 1 M. A part une faible partie de l'activité qui n'est pas retenue, la majeure partie de l'activité est adsorbée, puis relâchée à une concentration de phosphate de 0,2 à 0,25 M (pic SA2).

6.2.4. Identification

Les gels non dénaturants de la figure 26 montrent que l'activité du pic SA2 migre légèrement plus rapidement que l'enzyme I, à une vitesse relative correspondant approximativement à celle du pic D de la figure 13 A (afin d'écarter toute possibilité d'interprétation erronée due à la variabilité de migration d'une série de gels à l'autre, seule est prise en considération la migration relative de l'activité par rapport à l'enzyme I (standard) mesurée dans la même série de gels).

3.6.3. Activité s'adsorbant à la Con A-Sepharose

Le deuxième pic obtenu après la colonne de Sephadex G-25 (figure 25, pic SB) est retenu à environ 80 % sur une colonne de Con A-Sepharose. L'activité éluée en présence d' α -méthylmannoside migre sur les gels non dénaturants de façon analogue à celle des enzymes C*, quoique la faible résolution du gel pour les enzymes migrant lentement n'autorise pas de conclusions très fermes à ce sujet. Plus significatif est sans doute le fait que le gel dénaturant du pic SB, montré dans la figure 27, présente également un groupe de bandes migrant approximativement comme CA et CB. La rétention du pic SB sur Con A-Sepharose à l'instar des enzymes C permet aussi de supposer que les deux activités sont dues aux mêmes enzymes. Il faut cependant souligner qu'une véritable preuve

* Enzymes C : enzymes liées à la cellulose CA et CB

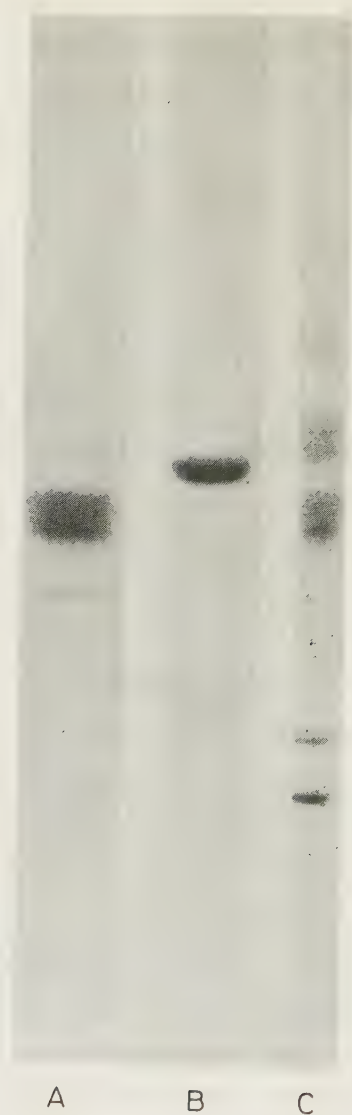


Figure 27 : Electrophorèse du pic SB sur gel dénaturant à 10 % d'acrylamide.

A et B, enzymes CA et CB purifiées (cf. fig. 17, C et D);
C, pic SB après rétention sur ConA-Sepharose et élution à 1' α -méthylmannoside.

de cette identité dépend de la purification de SB à homogénéité, qui n'a pas été effectuée en raison du mauvais rendement de l'étape de concentration au sulfate d'ammonium-BSA.

Cette observation implique que la subdivision de l'activité cellulolytique en activité libre et activité liée à la cellulose n'est pas fondée uniquement sur la présence d'enzymes différentes dans le surnageant et sur la cellulose. A ce propos, il faut noter également que l'enzyme I purifiée à partir du surnageant s'adsorbe à plus de 90 % sur une colonne de cellulose fraîche équilibrée avec du milieu M9 sans sucre.

La présence dans le surnageant de cellulases ayant une forte affinité pour la cellulose indique que les sites de fixation disponibles pour ces enzymes sur la cellulose dans les cultures sont vraisemblablement saturés. Cette saturation pourrait intervenir par suite de l'accumulation des enzymes en quantités trop importantes pour pouvoir être entièrement fixées. Cependant, étant donné que l'activité liée par gramme de cellulose diminue durant la phase stationnaire, la possibilité d'une modification de la cellulose réduisant le nombre de sites ayant une forte affinité pour les cellulases doit également être prise en considération.

3.7. Régulation

La cellulose sous forme native ne pouvant pénétrer dans la cellule pour interagir directement avec un effecteur cytoplasmique, les modes de régulation suivants peuvent être envisagés :

a) Induction par contact direct avec la cellulose

On peut imaginer que la cellulose interagisse avec des récepteurs situés sur la paroi externe de la cellule, induisant ainsi la production des enzymes cellulolytiques grâce à un mécanisme similaire à celui de certaines hormones.

b) Induction par des produits de dégradation de la cellulose

Ce modèle suppose qu'une faible quantité de cellulase est présente de manière constitutive à l'extérieur des cellules, permettant ainsi, en présence de cellulose, de libérer certains produits de dégradation solubles. Un de ces produits, par exemple le cellobiose, pourrait alors pénétrer dans la cellule et agir comme un inducteur classique. Il a été démontré pour plusieurs champignons que le cellobiose permet de produire plus de cellulase que le glucose ou d'autres hydrates de carbone non apparentés à la cellulose (Mandels & Reese, 1960). Cette induction est cependant faible en comparaison de celle obtenue avec la cellulose, probablement parce que dans les conditions normales, le cellobiose provoque également une répression de type catabolique (voir ci-dessous). Pour des champignons tels que Trichoderma viride, il est possible de réduire cette répression en ralentissant le taux de croissance par abaissement de la température (Mandels & Reese, 1960) ou en utilisant des esters du cellobiose, dont celui-ci est relâché lentement par des estérases présentes dans le milieu (Reese, Lola & Parrish, 1969).

Il est intéressant de noter que le sophorose (O- β -1,2-glucopyranosylglucose) agit comme un puissant inducteur chez Trichoderma viride (Mandels, Parrish & Reese, 1962) et chez Pseudomonas fluorescens (Yamane et al., 1970 a). Ce disaccharide, non apparenté à la cellulose, est présent comme

contaminant dans le glucose commercial, mais on ignore s'il joue réellement un rôle lors de l'induction par la cellulose. Il se pourrait que de faibles quantités de sophorose soient formées par transglycosylation lors de la dégradation de la cellulose.

c) Répression catabolique

Il est également possible que les cellulases soient exprimées constitutivement, mais réprimées en présence de sources de carbone de faible poids moléculaire facilement assimilables. On a pu montrer par exemple que chez Trichoderma lignorum (Lobanok & Pavlovskaya, 1975) ou Pseudomonas fluorescens (Yamane et al., 1970 a), un niveau constitutif d'enzyme apparaît lorsqu'on limite la concentration de la source de carbone, même si celle-ci n'est pas apparentée à la cellulose.

Cette régulation de type répression catabolique peut agir également de manière épistatique sur l'induction spécifique décrite précédemment : l'addition de glucose ou de cellobiose réprime ou retarde l'apparition d'activité cellulolytique dans des cultures de Trichoderma viride (Mandels, 1975) ou de Cellvibrio fulvus (Berg, von Hofsten & Pettersson, 1972) poussant en présence de cellulose.

Les expériences décrites ci-dessous visent à évaluer chez Cellulomonas flavigena la contribution respective de la répression catabolique et de l'induction spécifique par la cellulose ou ses dérivés dans la régulation des cellulases. La possibilité d'une induction par les produits de dégradation solubles a été examinée en testant l'effet du cellobiose sur l'activité cellulolytique.

3.7.1. Répression catabolique par les sources de carbone de faible poids moléculaire

Afin de mettre ce mécanisme en évidence, des substrats permettant une croissance optimale comme le glycérol ou le cellobiose ont été ajoutés à des cultures contenant de la cellulose, de manière à déterminer dans quelle mesure ils sont capables de réprimer la production de cellulase.

La table 9 montre que le glycérol et le cellobiose empêchent l'apparition de l'activité à la fois libre et liée à la cellulose lorsqu'on les ajoute à des cultures en cellulose. La situation est un peu compliquée pour le cellobiose par le fait que si les cultures sont incubées pendant assez longtemps, celui-ci est finalement totalement métabolisé et disparaît du milieu (comme on peut le voir en dosant les sucres réducteurs), de sorte que les cellulases finissent par être induites. Cet effet n'est pas observé avec le glycérol, peut-être parce que le cellobiose, mais non le glycérol, semble impliqué dans l'induction (voir ci-dessous). La présence d'AMP cyclique 1 mM est impuissante à annuler l'effet de cette répression. L'acétate, qui par lui-même ne permet qu'une croissance très lente, n'affecte pas l'activité cellulolytique de manière significative lorsqu'il est ajouté à des cultures en cellulose (table 9).

3.7.2. Induction spécifique par la cellulose

Afin de savoir si la production de cellulase est régulée uniquement par la disponibilité d'autres sources de carbone, des cellules furent cultivées en glycérol, lavées et resuspendues à une densité optique (600 nm) de 2 en milieu M9 contenant soit 2,5 % de cellulose, soit aucune source de

Table 9 : Induction de l'activité cellulolytique en présence de cellulose et répression par le glycérol et le cellobiose

Expérience	Source de carbone	Maximum de l'activité liée à la cellulose		Maximum de l'activité libre	
		U/ml	U/D.O. 600 nm	U/ml	U/D.O. 600 nm
1	Cellulose 2,5 % (w/v)	250	125	160	48
2	Aucune	-	-	<10	<8
3	Cellobiose 0,2 % Cellulose 2,5 % (w/v)	25	5,5	30	6,5
4	Glycérol 0,435 % (v/v) Cellulose 2,5 % (w/v)	25	15,5	15	5,3
5	Na-Acétate 50 mM Cellulose 2,5 % (w/v)	155	90	160	67
6	Na-Acétate 50 mM	-	-	<10	<5

Pour les expériences 1 et 2, des cultures en croissance exponentielle en M9-glycérol (0,435 %) ont été centrifugées, lavées en BU et resuspendues en M9 contenant les sources de carbone indiquées à une densité optique (600 nm) de 2. L'activité et la croissance ont été suivies ensuite pendant trois jours comme décrit dans matériel et méthodes. Dans la culture contenant de la cellulose, les cellules ont poussé jusqu'à une densité optique de 3,3. Aucune croissance n'a été observée sans source de carbone. Pour les expériences 3 à 6, des cultures ont été inoculées en M9 contenant les sources de carbone indiquées et l'activité suivie en même temps que la croissance.

carbone. Seule la culture contenant de la cellulose présente une production de cellulase détectable (table 9), montrant que la quantité d'enzyme produite de manière constitutive est minime, même en l'absence de toute répression catabolique. Ce résultat n'est probablement pas dû simplement à un blocage général de la synthèse des protéines provoqué par la croissance en source de carbone, étant donné que les cultures en acétate seul (substrat non répresseur) n'excrètent pas non plus d'activité mesurable (table 9).

3.7.3. Tentatives d'induction par des substrats solubles pouvant pénétrer dans les bactéries

La possibilité d'une induction spécifique par un substrat soluble dérivé de la cellulose a été examinée en comparant l'effet de faibles concentrations de cellobiose ou de glycérol sur la production de cellulase par Cellulomonas. Le glycérol a été choisi comme exemple de substrat non apparenté à la cellulose et en conséquence probablement non impliqué dans un mécanisme spécifique de la régulation des cellulases. Le cellobiose est un disaccharide dérivé de la cellulose, dont on a pu montrer pour Trichoderma viride et d'autres champignons qu'il est actif comme inducteur de l'activité cellulolytique, bien que son activité soit largement masquée dans les conditions normales par la répression catabolique (Mandels & Reese, 1960). Le cellobiose a été testé avec des concentrations variant de 20 fois, de manière à voir si une quantité suboptimale pour la croissance serait suffisante pour induire, sans provoquer une répression catabolique trop forte. Les résultats de la table 10 montrent que quand les cellules disposent de source de carbone en suffisance, les cultures

TABLEAU I. Brevet de carbones concentrés de glycérine et de cellobiose sur la production d'activité cellulolytique

Source de carbone	Jour 1		Jour 2	
	D.O. 600 nm	Activité extracellulaire U/ml	D.O. 600 nm	Activité extracellulaire U/ml
		U/D.O. 600 nm		U/D.O. 600 nm
Cellobiose 0,01 %	1,47	10	1,34	< 6
Cellobiose 0,02 %	1,50	15	1,53	16
Cellobiose 0,05 %	1,98	20	1,92	16
Cellobiose 0,1 %	2,67	27,5	2,96	17
Cellobiose 0,2 %	4,3	28	4,1	13
Glycérol 0,0087 %*	1,64	8,5	1,65	< 6
Glycérol 0,0174 %*	1,90	10	1,80	< 6
Glycérol 0,0435 %*	2,58	13,5	2,50	< 6
Glycérol 0,174 %*	6,4	14	5,9	14
Aucune	1,45	< 6	1,36	< 6
Cellulose 2,5 %	4,3	640	4,8	1200
				250

*(v/v)

Une culture exponentielle en L-Broth a été centrifugée, lavée en BU et resuspendue à une densité optique (600 nm) de 2 en milieu M9 contenant les sources de carbone indiquées. Après un net deux jours d'incubation à 37° C, des aliquotes ont été prélevés afin de mesurer la croissance et l'activité cellulolytique. Le cellobiose avait disparu des cultures après 1 jour. Dans la culture contenant de la cellulose, l'activité libre et l'activité liée à la cellulose ont été additionnées afin d'obtenir l'activité extracellulaire totale.

en cellobiose produisent environ deux fois plus d'activité que les cultures en glycérol. L'activité atteinte par une culture incubée de façon similaire en présence de cellulose est supérieure d'un ordre de grandeur aux niveaux observés pour n'importe quelle culture utilisant une source de carbone de faible poids moléculaire.

Pour terminer, comme il avait été démontré que le sophorose à basse concentration agit comme inducteur chez Trichoderma viride (Mandels et al., 1962) et chez Pseudomonas fluorescens (Yamane et al., 1970 a), son effet a été testé chez Cellulomonas flavigena. La table 11 montre que l'activité induite est très faible ou nulle, même à des concentrations suffisantes pour permettre une croissance significative de la culture.

3.7.4. Discussion

Il est donc clair que la production de cellulase extracellulaire par Cellulomonas est soumise à une répression par les sources de carbone de faible poids moléculaire facilement assimilables. Une telle répression a été décrite pour d'autres bactéries et champignons cellulolytiques (Berg et al., 1972, Yamane et al., 1970 a, Lobanok & Pavlovskaya, 1975, Mandels, 1975). Il semble cependant difficile d'imaginer que ce phénomène soit le seul mécanisme impliqué dans la régulation des cellulases chez Cellulomonas. L'absence d'activité détectable dans les cultures carencées en source de carbone ou poussant en présence d'un substrat non répresseur comme l'acétate suggère fortement qu'un inducteur est nécessaire pour un haut niveau d'expression des enzymes cellulolytiques, quoique les modalités détaillées de l'induction restent à

Table 11 : Effet du sophorose sur la production de cellulase

Concentration en sophorose	D.O. 600 nm	Activité extracellulaire	
		U/ml	U/D.O. 600 nm
0,066 %	1,54	13	8,4
0,02 %	0,875	<6	<7
0,0066 %	0,67	<6	<9
0,002 %	0,66	<6	<9
0,00066 %	0,62	<6	<10
0,0002 %	0,58	<6	<10
0 %	0,62	<6	<10

Une culture exponentielle en M9-glycérol (0,435 %) a été centrifugée, lavée en BU et resuspendue à une densité optique (600 nm) de 0,98 en M9 contenant les concentrations indiquées de sophorose. Après une incubation de 23 h à 37° C, des aliquotes ont été prélevés pour mesurer la croissance et l'activité cellulolytique extracellulaire. Les surnageants des trois premières cultures ont été dialysés contre du milieu M9 sans sucre avant de doser l'activité cellulolytique.

définir. Dans les conditions examinées, le cellobiose a une activité inductrice légèrement supérieure à celle du glycérol. Sous ce rapport, il est intéressant de rappeler que certains mutants clb⁻ comme le mutant 19 ne produisent, au contraire du type sauvage, que peu de cellulase en présence de cellulose et d'acétate (table 11). Dans l'hypothèse où ces mutants seraient bloqués au niveau du transport du cellobiose dans la cellule, ce qui est plausible étant donné que leur activité β -glucosidase est normale, l'absence d'induction des cellulases pourrait s'expliquer si le cellobiose est bien leur inducteur.

Le sophorose n'induit que très faiblement ou pas du tout. De même que pour le cellobiose, on ne peut cependant exclure que son activité inductrice soit largement oblitérée aussi longtemps que sa concentration est suffisante pour promouvoir la répression catabolique. D'autre part, il est également possible que les bactéries soient induites par contact direct avec la cellulose macromoléculaire.

Il faut noter pour terminer que les expériences décrites ci-dessus ne traitent que des cellulases extracellulaires. Je n'ai pas étudié la régulation de l'activité cellulolytique présente soit sur la face externe de la membrane (c.-à-d. démontrable sur les cellules intactes), soit dans le cytoplasme (c.-à-d. démontrable seulement après avoir lysé les cellules). Le contrôle de ces activités pourrait bien être différent du contrôle de l'activité extracellulaire, comme c'est le cas pour Pseudomonas fluorescens (Yamane et al., 1970 a) et Cellvibrio fulvus (Berg, 1975).

3.8. Effet du pyruvate sur la croissance et la production de cellulases

Au cours de la recherche d'un substrat ne provoquant pas de répression catabolique, il est apparu que le pyruvate de sodium ne permet pas la croissance lorsqu'il est présent comme seule source de carbone, mais qu'il stimule de manière significative la croissance maximale lorsqu'il est ajouté à des cultures poussant sur cellulose. Ce phénomène est illustré par la figure 28, qui montre que l'effet est détectable pour une concentration de 0,5 mM et pratiquement maximum pour une concentration de 5 mM. Cette stimulation de la croissance maximum s'accompagne d'une forte stimulation de l'activité cellulolytique, particulièrement pour les enzymes libres. La stimulation apparemment moins forte de l'activité liée à la cellulose tient peut-être au fait que le maximum de cette activité dure assez peu (voir figure 12) et en conséquence n'est peut-être pas aperçu en raison de l'espacement des mesures.

Le pyruvate 50 mM ajouté à des cellules en absence de cellulose n'induit aucune activité cellulolytique; il n'influence également pas les cellulases, ni libres, ni liées à la cellulose, lorsqu'il est présent à raison de 50 mM dans le milieu de dosage.

Son effet sur la croissance se manifeste également en présence d'autres sources de carbone. La figure 29 montre qu'en présence de glycérol en concentration non limitante, le pyruvate augmente la densité maximum de bactéries observée en phase stationnaire. La vitesse de croissance en phase exponentielle n'est cependant pas modifiée. Le fait

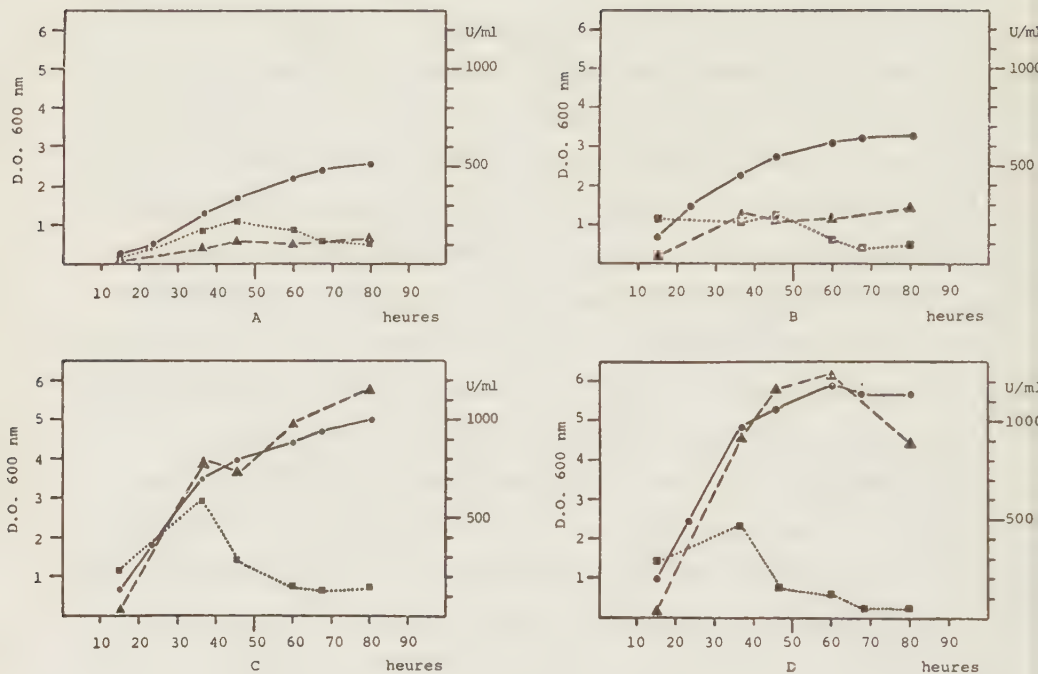


Figure 28 : Influence du pyruvate de sodium sur la croissance et l'activité cellulolytique des cultures en cellulose.

La croissance et l'activité de cultures de 80 ml en N9 + 2.5 % cellulose a été suivie à 37° comme décrit dans la figure 1. A, sans pyruvate; B, + pyruvate 0.5 mM; C, + pyruvate 5 mM; D, + pyruvate 50 mM. ● — ●, D.O. à 600 nm (croissance des cellules); ■ — ■, activité liée à la cellulose; ▲ — ▲, activité libre.

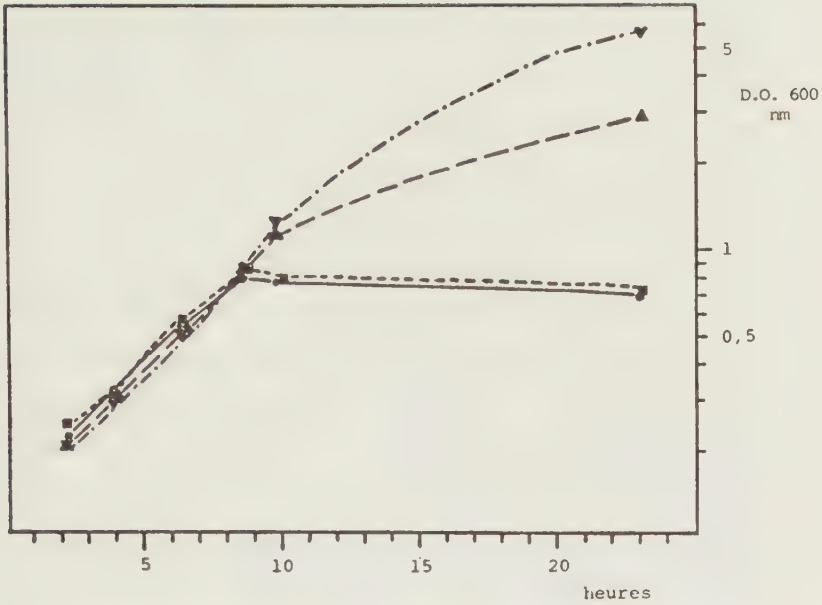


Figure 29 : Influence du pyruvate sur la croissance en présence de glycérol.

La croissance a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm en présence ou en absence de pyruvate avec des concentrations de glycérol limitantes ou non.

■-----■, glycérol 0,0215 %; ●——●, glycérol 0,0215 % + pyruvate de sodium 50 mM; ▲——▲, glycérol 0,43 %; ▼---▼, glycérol 0,43 % + pyruvate de sodium 50 mM.

d'abaisser la concentration en glycérol n'affecte pas le temps de génération mais provoque un arrêt de la croissance à une densité de cellules moindre. Dans ces conditions, le pyruvate n'a aucun effet, ni sur le taux de croissance, ni sur la densité maximum de la culture.

Une expérience d'incorporation a été effectuée avec du pyruvate marqué afin si possible d'éclaircir son mode d'action. La figure 30 montre que le pyruvate est accumulé dans les cellules et incorporé dans du matériel précipitable au TCA à froid (acides nucléiques + protéines) et à chaud (protéines). Cette incorporation est d'autant plus rapide que la source de carbone est limitante : pour les cultures carencées en carbone, la quasi totalité du marquage est incorporée dans les cellules après 70 min. Il semble donc que l'absence de croissance en présence de pyruvate ne soit pas due simplement à l'incapacité de celui-ci de pénétrer dans les cellules.

Un phénomène similaire a été décrit pour le succinate chez Cellulomonas fimi (Higuchi & Uemura, 1965 a et b). Pour cette bactérie, il a été montré que ce substrat, incapable de permettre par lui-même la croissance de la souche, stimule le niveau maximum de croissance et la synthèse de cellulase. La stimulation de l'activité cellulolytique semble indépendante de l'oxydation du succinate par le cycle de Krebs, étant donné que cette stimulation n'est pas affectée, mais au contraire accrue en milieu anaérobie. Au contraire de ce qui a été observé pour le pyruvate sur la souche IIbc, l'incubation des cellules de C. fimi en présence de succinate seul permet d'induire l'apparition de cellulases. Cette différence tient peut-être à la souche utilisée : la bactérie de Higuchi

Figure 30 : Incorporation de pyruvate marqué au ^{14}C .

Des cultures en M9-cellulose, M9-glycérol et M9 sans sucre ont été incubées en présence de pyruvate marqué et analysées comme suit :

Le pyruvate de sodium ($2\text{-}^{14}\text{C}$) a été ajouté à des cultures en croissance exponentielle à 37° à raison de $0,4 \text{ Ci/ml}$. Dans le cas de l'incorporation en M9-cellulose, M9-glycérol et M9 sans sucre, une culture exponentielle en glycérol a été centrifugée, lavée et incubée à 37° pendant 3 heures en milieu M9 sans source de carbone avant d'ajouter le pyruvate marqué. A des temps donnés après l'addition de marquage, trois aliquotes de culture ont été prélevées et traitées de la manière suivante :

- L'aliquote 1 a été immédiatement filtré sur Millipore et lavé avec du tampon BU. Après séchage, le filtre a été compté en Omnifluor (NEN) afin de mesurer l'incorporation de pyruvate dans les cellules.

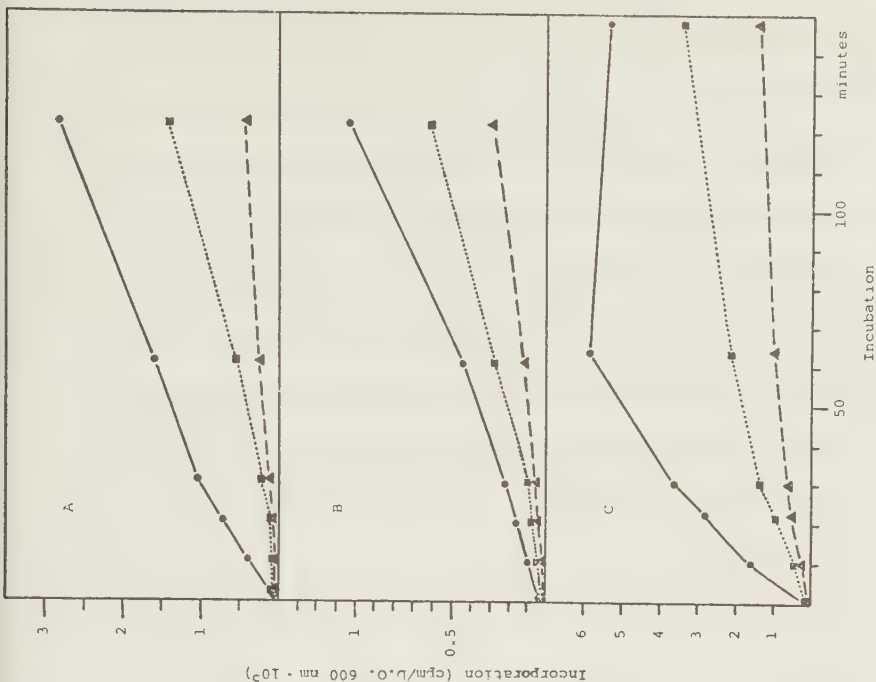
- L'aliquote 2 a été incubé pendant 2 minutes à 85°C en présence de SDS 1 %. Après addition de 8 volumes de TCA 10 % froid, le mélange a été filtré sur Millipore et rincé plusieurs fois au TCA 10 % froid. Après séchage, le filtre a été compté en Omnifluor afin de mesurer l'incorporation de marquage sous forme macromoléculaire (acides nucléiques et protéines).

- L'aliquote 3 a été incubé pendant 2 minutes à 85°C en présence de SDS 1 % comme l'aliquote 1, puis digéré pendant 15 minutes à 100°C en présence de 8 volumes de TCA 10 %. Le matériel insoluble est filtré, séché et compté afin d'obtenir la quantité de marquage incorporée dans les protéines.

A, incorporation en M9 + 2,5 % cellulose; B, incorporation en M9 + 0,43 % glycérol; C, incorporation en M9 sans sucre.

●—●, incorporation totale dans les cellules; ■—■, incorporation insoluble dans le TCA froid (acides nucléiques et protéines); ▲—▲, incorporation insoluble dans le TCA chaud (protéines).

La quantité de radioactivité incorporée dans les cellules à la fin de l'expérience correspond, pour la culture en cellulose, à 50 % de la radioactivité ajoutée au départ. Pour les cultures en glycérol et sans sucre, ce pourcentage s'élève respectivement à 20 % et à 95-100 %.



et Uemura peut également être induite par croissance en cellobiose, alors que ce n'est pratiquement pas le cas pour IIBC.

Bien que l'état actuel des données n'autorise pas d'hypothèses précises, il se pourrait que la stimulation de la croissance et de l'activité cellulolytique soit due à un mécanisme, probablement non spécifique, ayant rapport à l'état physiologique général des bactéries. A ce propos, il est intéressant de noter que la souche de Higuchi et Uemura est capable de pousser sur cellulose sans vitamines en culture aérobie, mais que la croissance sur cellulose en milieu anaérobie nécessite la présence de vitamines et d'acides aminés.

4. Récapitulation et conclusions

Les faits principaux que ce travail a permis d'établir chez Cellulomonas flavigena IIBC sont les suivants :

- L'activité β -glucosidase, liée aux cellules est due à la présence d'au moins deux enzymes différant par leur régulation et leurs propriétés enzymatiques, dont l'une possède une activité cellobiase.

Sur le plan génétique, le phénotype systématiquement cls⁻ des mutants clb⁻, ainsi que leur incapacité à être complétés en culture mixte par le type sauvage, confirment que le cellobiose est le métabolite intermédiaire qui est assimilé par les bactéries lors de la dégradation de la cellulose. En revanche, un mutant bloqué dans la production de cellulases pousse toujours sur cellobiose et peut être complété en culture mixte par les enzymes produites par le type sauvage.

- L'activité cellulolytique est en grande partie extracellulaire. Une fraction de l'activité extracellulaire est liée à la cellulose ajoutée comme source de carbone aux cultures, le reste étant libre dans le surnageant de la culture. La proportion de ces deux types d'enzymes varie avec l'âge de la culture, l'activité liée étant prédominante en début de croissance tandis que l'activité libre devient prépondérante durant la phase stationnaire.

Sur le plan biochimique, un minimum de quatre cellulases actives vis-à-vis de la CMC a été détecté. Deux d'entre elles ont été purifiées à partir de l'activité liée à la cellulose et une autre à partir de l'activité libre d'un surnageant de culture. Ces trois enzymes se comportent comme

des endocellulases. Deux d'entre elles sont glycosylées et se lient à la concanavaline A.

La régulation des cellulases dépend d'une part d'un mécanisme d'induction spécifique, stimulé fortement en présence de cellulose et beaucoup plus faiblement en présence de cellobiose, et d'autre part d'un mécanisme de répression catabolique qui bloque l'apparition des cellulases dans le milieu aussi longtemps que des sources de carbone facilement assimilables comme le glycérol ou le cellobiose, sont disponibles en quantité suffisante.

Le peu de renseignements disponibles au départ sur le système, ainsi que la nécessité d'en fonder l'étude sur une base aussi large que possible, justifiait une première approche horizontale. A partir de là, plusieurs thèmes mériteraient d'être approfondis. Citons, entre autres, l'analyse complète du système cellulolytique et en particulier des composants permettant l'attaque de la cellulose native. Sur le plan génétique, d'autres mutants clb⁻ pourraient être isolés facilement et caractérisés; toutefois, le problème le plus important, et dont la solution permettrait certainement d'obtenir de nombreux résultats, et de mettre au point un système fiable et rapide de détection des mutants affectant l'activité cellulolytique ou sa régulation. A plus long terme, il est clair qu'une analyse génétique approfondie nécessite un système de sexualité permettant de localiser les mutations et d'en étudier le phénotype dominant ou récessif au moyen d'hétérozygotes.

Du point de vue de l'utilisation pratique, tout

un travail d'optimalisation des conditions de croissance reste à faire. Il serait en particulier utile de tester d'autres substances que le pyruvate, comme par exemple le succinate ou d'autres acides organiques, afin de stimuler au maximum le rendement des cultures. D'autre part, la suppression de l'auxotrophie pour la biotine et la vitamine B₁ serait sans doute avantageuse pour l'utilisation industrielle.

REFERENCES

- ALEXANDER, J. K., 1968 : Purification and specificity of a cellobiose phosphorylase from Clostridium thermo-cellum. J. Biol. Chem. 243, 2899
- BEGUIN, P., A. ROUPAS & H. EISEN : Identification and characterization of a cellulose utilizing bacterium of the genus Cellulomonas. Soumis à J. Gen. Microbiol.
- BERG, B., B. von HOFSTEN & G. PETTERSSON, 1972 : Growth and cellulase formation by Cellvibrio fulvus. J. Appl. Microbiol. 35, 201
- BERG, B., 1975 : Cellulase location in Cellvibrio fulvus. Can. J. Microbiol. 21, 51
- BERGHEM, L. E. R. & L. G. PETTERSSON, 1973 : The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from Trichoderma viride active on highly ordered cellulose. Eur. J. Biochem. 37, 21
- BERGHEM, L. E. R. & L. G. PETTERSSON, 1974 : The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β -glucosidase from Trichoderma viride. Eur. J. Biochem. 46, 295
- BERGHEM, L. E. R., L. G. PETTERSSON & U. B. AXIÖ-FREDERIKSSON, 1975 : The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucan cellobiohydrolase from Trichoderma viride. Eur. J. Biochem. 53, 55

- BERGHEM, L. E. R., L. G. PETERSSON & U. B. AXIÖ-FREDERIKSSON,
1976 : The mechanism of enzymatic cellulose degradation : purification and some properties of two different 1,4- β -glucan glucanohydrolases from Trichoderma viride. Eur. J. Biochem. 61, 621
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974, 8^e
édition. Edité par R. S. BREAD, E. G. D. MURRAY
& N. R. SMITH. Londres : Baillères, Tindall & Cox
- COWLING, E. B., 1975 : Physical and chemical constraints in
the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic
materials. Biotechnol. and Bioeng. Symposium No 5,
163
- CUATRECASAS, P., 1970 : Protein purification by affinity
chromatography. J. Biol. Chem. 245, 3059
- EBERHART, B., D. F. CROSS & L. R. CHASE, 1964 : β -glucosidase system of Neurospora crassa. β -glucosidase and cellulase activities of mutant and wild type strains. J. Bacteriol. 87, 761
- EBERHART, B. M. & R. S. BECK, 1973 : Induction of β -glucosidases in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 116, 295
- ENGER, M. D. & B. P. SLEEPER, 1965 : Multiple cellulase system from Streptomyces antibioticus. J. Bacteriol. 89, 23
- ERIKSSON, K. E., B. PETERSSON & U. WESTERMARK, 1974 :
Oxidation : an important reaction in fungal degradation of cellulose. FEBS-Letters 49, 282

- ERIKSSON, K. E. & B. PETTERSSON, 1975 a : Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases. Eur. J. Biochem. 51, 193
- ERIKSSON, K. E. & B. PETTERSSON, 1975 b : Extracellular enzyme system utilized by the fungus Sporotrichum pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase. Eur. J. Biochem. 51, 213
- FAIRBANKS, G., T. L. STECK & D. F. H. WALLACH, 1971 : Electrophoretic analysis of the major protein bands of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10, 2606
- GILLIGAN, W. & E. T. REESE, 1954 : Evidence for multiple components in microbial cellulases. Can J. Microbiol. 1, 90
- HALLIWELL, G. & M. GRIFFIN, 1973 : The nature and mode of action of the cellulolytic component C₁ of Trichoderma koningii on native cellulose. Biochem. J. 135, 587
- HAN, Y. W. & V. R. SRINIVASAN, 1968 : Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. Applied Microbiol. 16, 1140
- HAN, Y. W. & V. R. SRINIVASAN, 1969 : Purification and characterization of β -glucosidase from Alcaligenes faecalis. J. Bacteriol. 100, 1355

- Handbook of Biochemistry, 2ème édition, 1970. Editeurs :
H. A. SOBER, R. A. HARTE & E. K. SOBER. Publié
par The Chemical Rubber CO., Cleveland.
- HERMAN, A. & H. HALVORSON, 1963 : Identification of the
structural gene for β -glucosidase synthesis in
Saccharomyces lactis. J. Bacteriol. 85, 895
- HIGUCHI, M. & T. UEMURA, 1965 a : Effect of succinate on
the cellulose decomposition by the ruminal bacte-
ria. I. Stimulative effect of succinate on the
cellulase formation in Cellulomonas fimi isola-
ted from sheep rumen. J. Gen. Appl. Microbiol. 11,
137
- HIGUCHI, M. & T. UEMURA, 1965 b : Effect of succinate on
cellulose decomposition by the ruminal bacteria.
II. Inducer-like effect of succinate on the cellu-
lase formation in Cellulomonas fimi isolated from
sheep rumen. J. Gen. Appl. Microbiol. 11, 145
- HUGGETT, A. St G. & D. A. NIXON, 1957 : Enzymic determina-
tion of blood glucose. Biochem. J. 66, 12 P
- HUMPHREY, A. E., 1975 : Economical factors in the asses-
ment of various carbon sources as chemical and
energy resources. Biotechnol. and Bioeng. Sympo-
sium No 5, 49
- HUTTERMAN, A. & C. VOLGER, 1973 : Cellobiose phosphorylase
in Fomes annosus. Nature New Biology 245, 64
- KANFER, J. N., R. A. MUMFORD, S. S. RAGHAVAN & J. BYRD, 1974 :
Purification of β -glucosidase activities from
bovine spleen by affinity chromatography. Anal.
Biochem. 60, 200

- KOENIGS, J. W., 1975 : Hydrogen peroxide and iron : a microbial cellulolytic system ? Biotechnol. & Bioeng. Symposium No 5, 151
- The Lactose Operon, 1970. Edité par J. BECKWITH & D. ZIPSER, New York : Cold Spring Harbor Laboratory
- LALEGERIE, P., 1974 : La β -glucosidase de l'amande douce (*Amygdalus communis* L.). I. Isolement et purification. Biochimie 56, 1163
- LÄMMLI, U. K., 1970 : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680
- LOBANOK, A. V. & Zh. I. PAVOLVSKAYA, 1975. Derepression of cellulase synthesis in *Trichoderma lignorum* during limited consumption of readily assimilated carbon sources. Microbiology (trad. de Mikrobiologiya) 44, 25
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. D. RANDALL, 1951 : Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265
- MAHADEVAN, P. R. & B. M. EBERHART, 1964 : β -glucosidase system of *Neurospora crassa*. Purification and characterization of aryl- β -glucosidase. Arch. Biochem. Biophys. 108, 22
- MANDELS, M. & E. T. REESE, 1960 : Induction of cellulases in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 79, 816
- MANDELS, M., F. W. PARRISH & E. T. REESE, 1962 : Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. J. Bacteriol. 83, 400

- MANDELS, M., 1975 : Microbial sources of cellulases. Biotechnol. and Bioeng. Symposium No 5, 81
- MARSHALL, J. J., 1973 : Behavior of β -glucan hydrolases on ion exchangers. Anal. Biochem. 53, 191
- MEMOLI, V. A. & G. J. DOELLGAST, 1975 : Hemoglobin and serum albumin. Salt mediated hydrophobic chromatography. Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 1011
- MILLER, G. L., 1960 : Micro column chromatographic method for the analysis of oligosaccharides. Anal. Biochem. 2, 133
- MILLER, J. H., 1972 : Experiments in Molecular Genetics, pp. 431-433. New York : Cold Spring Harbor Laboratory
- NELSON, N., 1944 : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose J. Biol. Chem. 153, 375
- OSMUNDVAG, K. & J. GOKSØYR, 1975 : Cellulases from Sporocytophaga myxocoides. Purification and properties. Eur. J. Biochem. 57, 405
- PETTERSSON, G. & J. PORATH, 1963 : Studies on cellulolytic enzymes. II. Multiplicity of the cellulolytic enzymes of Polyporus versicolor. Biochim. Biophys. Acta, 67, 9
- PORETZ, R. D. & I. J. GOLDSTEIN, 1970 : An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and of the forces involved in complexation. Biochemistry 9, 2890
- PRASAD, I. & S. SCHAEFLER, 1974 : Regulation of the β -glucoside system in Escherichia coli K 12. J. Bacteriol. 120, 638

- REESE, E. T., J. E. LOLA & F. W. PARRISH, 1969 : Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases. *J. Bacteriol.* 100, 1151
- RIMERMAN, R. A. & G. HATFIELD, 1973 : Phosphate-induced protein chromatography. *Science* 182, 1268
- SATO, M. & H. TAKAHASHI, 1967 : Fermentation of ^{14}C -labeled cellobiose by Cellulomonas fimi. *Agr. Biol. Chem.* 31, 470
- SCHAEFLER, S. & A. MALAMY, 1969 : Taxonomic investigations on expressed and cryptic phospho- β -glucosidases in Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 99, 422
- SETH, K. & J. K. ALEXANDER, 1969 : Purification and properties of a β -1,4-oligoglucan orthophosphate glucosyltransferase from Clostridium thermocellum. *J. Biol. Chem.* 244, 457
- SOBOTKA, F. E. & D. A. STELZIG, 1973 : Lactone inhibition of the β -glucosidase contaminant of an enzymatic reagent used for glucose assays. *Anal. Biochem.* 54, 612
- SOMOGYI, M., 1952 : Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19
- STORVICK, V. O. & K. W. KING, 1960 : The complexity and mode of action of the cellulase system of Cellulivibrio gilvus
- WESTERMARK, U. & K.E. ERIKSSON, 1975 : Purification and properties of cellobiose : quinone oxidoreductase from Sporotrichum pulverulentum. *Acta Chem. Scand.* 29, 419
- WOOD, T. M., 1968 : Cellulolytic enzyme system of Trichoderma koningi : Separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.* 109, 217

- WOOD, T. M. & S. I. McCRAE, 1972 : The purification and properties of the C₁ component of Trichoderma koningii cellulase. Biochem. J. 128, 1183
- WOOD, T. M., 1975 : Properties and mode of action of cellulases. Biotechnol. and Bioeng. Symposium No 5, 111
- YAMANE, K., H. SUZUKI, M. HIROTANI, H. OZAWA & K. NISIZAWA, 1970 a : Effect of nature and supply of carbon source on cellulase formation in Pseudomonas fluorescens var. cellulosa. J. Biochem. (Tokyo) 67, 9
- YAMANE, K., H. SUZUKI & K. NISIZAWA, 1970 b : Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of Pseudomonas fluorescens var. cellulosa. J. Biochem. (Tokyo) 67, 19
- YAMANE, K., T. YOSHIKAWA, H. SUZUKI & K. NISIZAWA, 1971 : Localization of cellulase components in Pseudomonas fluorescens var. cellulosa. J. Biochem. (Tokyo) 69, 771

